

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/054617 A1(51) 国際特許分類: A61K 45/00,
31/505, 31/506, 31/7088, 31/7125, 39/395, 31/7125,
39/395, 48/00, A61P 25/00, 25/08, 25/14, 25/16, 25/18,
25/22, 25/24, 25/28, 25/30, 43/00, C07D 239/48, 403/04,
401/04, 401/12, 405/12, 405/14, 409/12, 491/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015982

(22) 国際出願日: 2003年12月12日 (12.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-362196

2002年12月13日 (13.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和
醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一
丁目6番1号 Tokyo (JP).

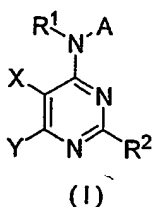
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 溝口 歩 (MI-
ZOGUCHI, Ayumi) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会
社 本社内 Tokyo (JP). 佐々木 克敏 (SASAKI, Katsu-
toshi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土
狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所
内 Shizuoka (JP). 篠原 浩二 (HAGIHARA, Koji) [JP/JP];
〒590-8554 大阪府堺市高須町一丁目5番3号 協
和醸酵工業株式会社 堺研究所内 Osaka (JP). 青山 史
朗 (AOYAMA, Shirou) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東
郡長泉町下土狩 1188 協和醸酵工業株式会
社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 野中 裕美 (NON-
AKA, Hiromi) [JP/JP]; 〒351-0006 埼玉県朝霞市仲
町 2-2-38-902 Saitama (JP). 新井 仁 (ARAI, Hi-
toshi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土
狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内
Shizuoka (JP). 塩崎 静男 (SHIOZAKI, Shizuo) [JP/JP];
〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 協
和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).
桑名 良寿 (KUWANA, Yoshihisa) [JP/JP]; 〒100-8185 東
京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株
式会社 本社内 Tokyo (JP). 大坪 伸将 (OTSUBO, Nobu-
masa) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土
狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所
内 Shizuoka (JP).

[続葉有]

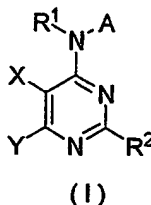
(54) Title: PREVENTIVES AND/OR REMEDIES FOR CENTRAL DISEASES

(54) 発明の名称: 中枢疾患の予防および/または治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a preventive and/or a remedy for central diseases containing, as the active ingredient, a substance having an effect of inhibiting the function of G-protein coupled receptor 88 (GPR88), and a pyrimidine derivative represented by the following general formula (I): (I) wherein A represents optionally substituted aryl, etc.; R¹ represents hydrogen, etc.; R² represents -NR³R⁴, etc.; X represents -C(=O)R⁵, etc.; and Y represents hydrogen, etc.; its pharmacologically acceptable salt, etc.

(57) 要約:

G蛋白質共役型レセプター蛋白質88 (GPR88 ; G-Protein coupled receptor 88) の機能抑制作用を有する物質を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤、および式 (I)

(式中、Aは置換もしくは非置換のアリール等を表し、R¹は水素原子等を表し、R²は-NR³R⁴等を表し、Xは-C(=O)R⁵等を表し、Yは水素原子等を表す) で表されるピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩等を提供する。



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

中枢疾患の予防および／または治療剤

技術分野

本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質88（GPR88；G-Protein coupled receptor 88）の機能抑制作用を有する物質を有効成分として含有する中枢疾患の予防および／または治療剤に関する。また本発明は、GPR88の機能抑制作用を有し、中枢疾患の予防および／または治療に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはピリミジン誘導体もしくはその薬理学的に許容される塩に関する。

背景技術

パーキンソン病は、黒質のドパミン作動性神経細胞が進行性に変性脱落し、その投射部位である線条体の神経活動が異常になることにより発症する運動障害である。現在、レボドーパ（levodopa）、ドパミン受容体作動薬等により、症状を改善することができるとされている。しかし、levodopaやドパミン受容体作動薬を、2～3年以上の長期に渡って服用すると、不随意運動や精神障害等の副作用や、薬効における耐性が現れることが知られていることから、新しい作用機序を有する副作用の少ない治療剤が求められている。

また中枢疾患としては、パーキンソン病の他に、うつ病、不安、精神分裂病等の精神疾患等が挙げられるが、これらの疾患の治療剤に関しても、新しい作用機序を有する副作用の少ない治療剤が求められている。

GPR88はリガンドおよび機能が不明なオーファンG蛋白質共役型受容体（GPCR）であり、ヒト、ラットおよびマウスのGPR88のcDNAが単離され、各cDNAの塩基配列およびそれらがコードする各GPR88のアミノ酸配列が報告されている（「ジェノミクス（Genomics）」、2000年、第69巻、p.314-321）。GPR88はそのmRNAが特に線条体、側坐核や小脳のオリブ核に特異的に発現し、一方で末梢組織での発現は極めて低いことから、なんらかの運動調節作用、および／または情動調節作用を有することが推察されるが、今までのところ実験的にこのことを示した報告はない。

一方、ピリミジン環、ピリジン環またはベンゼン環をその構造中に有する化合物が、炎症治療剤（国際公開第WO97/09315号）、Sykチロシンキナーゼ阻害剤（国際公開第WO99/31073号、国際公開第WO2000/75113号）、V型ホスホジエステラーゼ阻害剤（国際公開第WO2001/83460号）、抗ウイルス剤（国際公開第WO99/41253号）、抗腫瘍剤（国際公開第WO2000/39101号）、プロテインキナーゼC阻害剤（国際公開第WO2000/76980号）、CD40機能阻害剤（特開2001-89452号公報）、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3阻害剤（国際公開第WO2002/20495号、国際公開第WO99/65897号）として、それぞれ知られている。

発明の開示

本発明の目的は、(A) GPR88の機能抑制作用を有する物質を有効成分として含有する中枢疾患の予防および／または治療剤を提供すること、(B) 中枢疾患の予防および／または治療に有用なGPR88アンチセンスヌクレオチドまたはピリミジン誘導体もしくはその薬理学的に許容される塩等を提供することである。

本発明は、以下の(1)～(65)に関する。

(1) G蛋白質共役型レセプター蛋白質88 (GPR88; G-Protein coupled receptor 88) の機能抑制作用を有する物質を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。

(2) 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である (1) 記載の予防および/または治療剤。

(3) (a)試験化合物をGPR88発現細胞に接触させ、細胞応答を測定する工程と、(b)該試験化合物を添加しない場合のGPR88発現細胞の細胞応答と比較して、試験化合物を接触させた場合の細胞応答が低下することを確認する工程とを含む中枢疾患の予防および/または治療作用を有する化合物のスクリーニング方法。

(4) 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である (3) 記載の方法。

(5) GPR88の機能抑制作用を有する物質が配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである (1) 記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(6) GPR88の機能抑制作用を有する物質が、GPR88に対する抗体である

(1) 記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(7) (3) 記載のスクリーニング方法によって確認されたGPR88の細胞応答を低下させる化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。

(8) 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である (5) ~ (7) のいずれかに記載の予防および/または治療剤。

(9) 配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。

(10) 配列番号8で表される配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

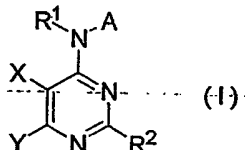
(11) アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホロチオエート・オリゴデオキシヌクレオチドである (10) 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(12) (10) または (11) 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。

(13) (10) または (11) 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。

(14) 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である (13) 記載の予防および/または治療剤。

(15) 式 (I)



<式中、Aは置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリールオキシアルキル、置換もしくは非置換のアラルキルオキシアルキル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素

環アルキルまたはシクロアルキルアルキルを表し、

R^1 は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルを表すか、

またはAと R^1 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成し、

R^2 は水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルキルチオ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキルまたは $-NR^3R^4$ (式中、 R^3 および R^4 は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換の複素環基または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、または R^3 と R^4 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)を表し、

Xは $-C(=O)R^5$ (式中、 R^5 はヒドロキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシまたは $-NR^6R^7$ (式中、 R^6 および R^7 は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ヒドロキシまたは $-SO_2R^8$ (式中、 R^8 は置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)を表すか、または R^6 と R^7 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)を表す)、ニトロ、置換もしくは非置換のヒドロキシメチルまたは1,2,3,4-テトラゾール-5-イルを表し、

Yは、水素原子、ハロゲンまたは置換もしくは非置換の低級アルキルを表す>で表されるピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。

(16) Yが水素原子である (15) 記載のGPR88の機能抑制剤。

(17) R^2 が $-NR^3R^4$ (式中、 R^3 および R^4 はそれぞれ前記と同義である) である (15) または (16) 記載のGPR88の機能抑制剤。

(18) Xが1,2,3,4-テトラゾール-5-イルである (15) ~ (17) のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

(19) Xが $-C(=O)NR^6R^7$ (式中、 R^6 および R^7 はそれぞれ前記と同義である) である (15) ~ (17) のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

(20) Xが $-C(=O)R^{5B}$ (式中、 R^{5B} はヒドロキシまたは低級アルコキシを表す) である (15) ~ (17) のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

(21) Xが置換もしくは非置換のヒドロキシメチルである (15) ~ (17) のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

(22) Aが置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル

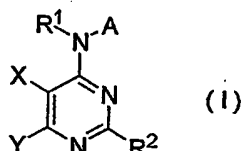
または置換もしくは非置換の複素環基である (15) ~ (21) のいずれかに記載の GPR88 の機能抑制剤。

(23) R^1 が水素原子である (15) ~ (22) のいずれかに記載の GPR88 の機能抑制剤。

(24) R^3 が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであるか、または R^3 と R^4 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する (17) ~ (23) のいずれかに記載の GPR88 の機能抑制剤。

(25) R^3 が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであり、 R^4 が水素原子または低級アルキルである (17) ~ (23) のいずれかに記載の GPR88 の機能抑制剤。

(26) 式 (I)



(式中、A、 R^1 、 R^2 、X および Y はそれぞれ前記と同義である) で表されるピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。

(27) Y が水素原子である (26) 記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(28) R^2 が $-NR^3R^4$ (式中、 R^3 および R^4 はそれぞれ前記と同義である) である (26) または (27) 記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(29) X が 1,2,3,4-テトラゾール-5-イルである (26) ~ (28) のいずれかに記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(30) X が $-C(=O)NR^6R^7$ (式中、 R^6 および R^7 はそれぞれ前記と同義である) である (26) ~ (28) のいずれかに記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(31) X が $-C(=O)R^{5B}$ (式中、 R^{5B} はヒドロキシまたは低級アルコキシを表す) である (26) ~ (28) のいずれかに記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(32) X が置換もしくは非置換のヒドロキシメチルである (26) ~ (28) のいずれかに記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(33) A が置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキルまたは置換もしくは非置換の複素環基である (26) ~ (32) のいずれかに記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(34) R^1 が水素原子である (26) ~ (33) のいずれかに記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

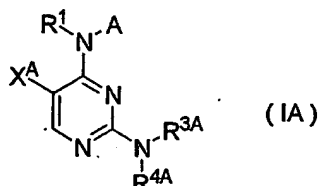
(35) R^3 が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであるか、または R^3 と R^4 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する (28) ~ (34) のいずれかに記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。

(36) R^3 が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルま

たは置換もしくは非置換のアラルキルであり、 R^4 が水素原子または低級アルキルである (28) ~ (34) のいずれかに記載の中樞疾患の予防および/または治療剤。

(37) 中樞疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である (26) ~ (36) のいずれかに記載の予防および/または治療剤。

(38) 式 (IA)



{式中、 A および R^1 はそれぞれ前記と同義であり、 X^A は1,2,3,4-テトラゾール-5-イル、 $-C(=O)R^{5A}$ [式中、 R^{5A} はヒドロキシまたは $-NR^{6A}R^{7A}$ (式中、 R^{6A} は水素原子または低級アルキルを表し、 R^{7A} は水素原子、ヒドロキシ、ヒドロキシ低級アルキル、カルボキシ低級アルキル、 p -トルエンスルホニル、メタンスルホニルまたはトリフルオロメタンスルホニルを表す) を表す] または置換もしくは非置換のヒドロキシメチルを表し、(i) X^A が1,2,3,4-テトラゾール-5-イルであるとき、 R^{3A} および R^{4A} は、同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルを表す (ただし、同時に水素原子にはならない) か、または R^{3A} と R^{4A} が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成し、(ii) X^A が $-C(=O)R^{5A}$ または置換もしくは非置換のヒドロキシメチルであるとき、 R^{3A} および R^{4A} は、同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換の複素環アルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルを表す (ただし、同時に水素原子にはならない) か、または R^{3A} と R^{4A} が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換のピペラジニル、4-メチルホモピペラジニル、4-メチルピペリジノ、4-ピペリジノピペリジノ、4-ベンジルピペリジノ、4,4-エチレンジオキシピペリジノまたはデカヒドロイソキノリン-1-イルを形成する} で表されるピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(39) X^A が1,2,3,4-テトラゾール-5-イルである (38) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(40) X^A が $-C(=O)R^{5A}$ (式中、 R^{5A} は前記と同義である) である (38) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(41) X^A が $-C(=O)OH$ である (38) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(42) X^A がヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチルまたは1-ヒドロキシ-1-メチルエチルである (38) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(43) A が置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリールオキシアラルキル、置換もしくは非置換の複素環基またはシクロアルキルアルキルであるか、または A と R^1 が隣接する窒素原子と

一緒になって置換もしくは非置換の複素環基を形成する (38) ~ (42) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(44) Aが置換もしくは非置換のアリール、アラルキル、複素環基またはシクロアルキルアルキルである (38) ~ (42) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(45) Aがベンジル、4-フェニル-n-ブチル、3-フェニルプロピル、3-フェニル-1-メチルプロピル、2-フェニルプロピル、2-フェノキシエチル、2-フェノキシ-1-メチルエチル、1,4-ベンゾジオキサン-6-イル、2-ベンジルフェニル、2-フェノキシフェニル、3-フェノキシフェニル、4-フェノキシフェニル、4-ピフェニル、ピフェニル-4-イルメチル、2-インダニルおよびシクロプロピルメチルからなる群から選ばれる基である (38) ~ (42) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(46) R¹が水素原子、低級アルキルまたはアラルキルである請求の範囲第38~45項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(47) R¹が水素原子である (38) ~ (45) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(48) R^{3A}およびR^{4A}が同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換のアラルキルまたは置換もしくは非置換の複素環アルキルであるか、またはR^{3A}とR^{4A}が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する

(38) ~ (47) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(49) R^{3A}およびR^{4A}が同一または異なって、水素原子、低級アルキル、シクロアルキルメチル、置換もしくは非置換のアラルキルまたは複素環アルキルである (38) ~ (47) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(50) R^{3A}が低級アルキル、シクロアルキルメチルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであり、R^{4A}が水素原子である (38) ~ (47) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(51) R^{3A}が3-メトキシベンジル、3-クロロベンジル、3-フルオロベンジル、2,6-ジフルオロベンジル、2-メチルベンジル、3-トリフルオロベンジル、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、シクロヘキシルメチル、シクロヘブチル、1,5-ジメチル-n-ヘキシルおよび2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-2-イルメチルからなる群から選ばれる基であり、R^{4A}が水素原子であるか、R^{3A}がベンジルでありR^{4A}がn-ブチルであるか、R^{3A}がn-ヘキシルでありR^{4A}がメチルであるか、またはR^{3A}とR^{4A}が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する (38) および

(40) ~ (47) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(52) R^{3A}が3-メトキシベンジル、3-クロロベンジル、3-フルオロベンジル、2,6-ジフルオロベンジル、2-メチルベンジル、3-トリフルオロベンジル、シクロヘ

キシルメチル、シクロヘプチルおよび1,5-ジメチル-n-ヘキシルからなる群から選ばれる基であり、R^{4A}が水素原子であるか、R^{3A}がベンジルでありR^{4A}がn-ブチルであるか、R^{3A}がn-ヘキシルでありR^{4A}がメチルであるか、またはR^{3A}とR^{4A}が隣接する窒素原子と一緒にあって4-ベンジルペリジノ、4,4-エチレンジオキシペリジノもしくはデカヒドロイソキノリン-1-イルを形成する (39) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

(53) 式(IA)で表される化合物が、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボヒドロキサム酸、[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]アミノ酢酸、{[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]メチルアミノ}酢酸、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン、N-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド、N-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]メタンスルホンアミド、[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]トリフルオロメタンスルホンアミド、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-4-(1-メチル-2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(4-フェニルペリジノ-1-イル)-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(1-メチル-2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、2-(ベンジルブチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、5-ヒドロキシメチル-2-(オクタヒドロイソキノリン-2-イル)-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン、5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェニルプロピルアミノ)-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン、5-ヒドロキシメチル-4-(4-フェニルペリジノ-1-イル)-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(3-クロロベンジルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(3-フルオロベンジルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(ベンジルブチルアミノ)-4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(3-メトキシベンジルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(2,6-ジフルオロベンジルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(2-メチルベンジルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2-フェノキシフェニルアミノ)-2-(3-トリフルオロベンジルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(3-フルオロベンジルアミノ)-4-(4-フェニルブチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(ベンジルブチルアミノ)-4-(4-ビフェニルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミ

ノ)-5-ヒドロキシメチル-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン、4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-(2-ピリジルメチルアミノ)ピリミジンおよび 2-[ビス(2-メトキシエチル)アミノ]-4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミノ)-5-ヒドロキシメチルピリミジン、2-(3-フルオロベンジルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジンからなる群から選択される化合物であるピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩。

(54) (38) ~ (53) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する医薬。

(55) (38) ~ (53) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。

(56) (38) ~ (53) のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。

(57) 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である (56) 記載の予防および/または治療剤。

(58) 中枢疾患の予防および/または治療剤の製造のための、GPR88の機能抑制作用を有する物質の使用。

(59) GPR88の機能抑制剤の製造のための、配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

(60) GPR88の機能抑制剤の製造のための、(15) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩の使用。

(61) 中枢疾患の予防および/または治療剤の製造のための、(15) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩の使用。

(62) GPR88の機能抑制作用を有する物質の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患の予防および/または治療方法。

(63) 配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とするGPR88の機能抑制方法。

(64) (15) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とするGPR88の機能抑制方法。

(65) (15) 記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患の予防および/または治療方法。

本発明において、GPR88としては、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するヒトGPR88ポリペプチド、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するマウスGPR88ポリペプチドおよび配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するラットのGPR88ポリペプチドが挙げられる。また、ヒトGPR88 cDNAのコード領域の配列である配列番号1で表される塩基配列の438~1592番目の配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする、上記のポリペプチドと実質的に同一な機能を有するポリペプチドも含まれる。本発明で用いるGPR88としては、特に配列番号2で表されるアミノ酸配列を

有するヒトGPR88ポリペプチドが好ましい。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号1で表される塩基配列と相補的な配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/LのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L NaCl、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-2001)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

<GPR88発現細胞を用いた、GPR88の構成活性阻害物質、中枢疾患の予防および／または治療のための作用を有する化合物のスクリーニング法>

参考例5~7に示す通り、GPR88は、細胞に過剰に発現させた際に、リガンドが存在しなくても活性化し、シグナル情報伝達を起こす構成活性型GPCRであるため、GPR88を発現する細胞は、リガンドが存在しなくてもGPR88の活性化に伴う細胞応答を示す。GPR88を発現する細胞に任意の試験物質を添加して、該細胞と試験物質とを接触させた場合の該細胞の細胞応答と、試験物質を添加しない場合の該細胞の細胞応答をそれぞれ測定して比較し、試験物質を添加しなかった場合と比較して、試験物質を添加した場合の細胞応答が低下する試験物質を、GPR88の構成活性阻害物質として選択することができる。また、他の構成活性型GPCRを発現させた細胞を以下に示すGPR88発現細胞と同様にして作製し、上記の方法と同様にして、該細胞と上記の方法で選択された物質とを接触させた場合の細胞応答の低下を測定して、GPR88発現細胞での細胞応答の低下と比較することにより、選択された物質がGPR88特異的に構成活性を阻害するかどうかを調べることができる。GPR88の構成活性阻害物質は、GPR88の機能を抑制する作用を有しており、GPR88の機能抑制剤となる。GPR88の構成活性阻害物質には、GPR88と結合してその構成活性を阻害するインバーシアゴニスト、GPR88とG蛋白質とのカップリングを阻害する物質等のGPR88が関与するシグナル伝達を阻害する物質が含まれる。後述するように、GPR88の機能抑制剤は、中枢疾患の予防および／または治療に有効であるので、上記の方法により中枢疾患治療薬または予防作用を有する化合物をスクリーニングすることができる。

GPR88を発現する細胞は、GPR88を天然に発現する組織から、あるいはGPR88をコードするDNAを含む発現ベクター（GPR88発現ベクター）を宿主細胞に導入することによって得ることができる。GPR88の構成活性を測定するためには、

GPR88を大量に発現している細胞が適しているため、GPR88発現ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞が好ましい。

GPR88をコードするDNAは、以下のようにして取得できる。GPR88 cDNAの塩基配列、例えば配列番号1で表されるヒトGPR88 cDNAの塩基配列を元にして、該受容体をコードする領域を含む該cDNAの領域を適当に選択する。選択した領域の塩基配列の5'端20～40塩基の配列を3'端に含むDNA、選択した領域の塩基配列の3'端20～40塩基と相補的な配列を3'端に含むDNAをそれぞれDNA合成機で合成する。例えば、配列番号26および27で表される塩基配列をそれぞれ有するDNAが例示される。組織や細胞から染色体DNAまたはcDNAを調製する。cDNAの場合はGPR88が発現している組織や細胞を用いる。調製した染色体DNAまたはcDNAを鋳型とし、2種類の合成DNAをプライマーとして用いたPCRにより該受容体をコードするDNAを増幅し単離することができる。組織や細胞からの染色体DNAまたはcDNAの調製、およびPCRはMolecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載の方法に従って行うことができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、導入する宿主細胞で機能するプロモーターを含有しているものを用いることができる。発現ベクター中のプロモーターの下流にGPR88をコードするDNAを挿入することにより、GPR88発現ベクターを構築することができる。

宿主細胞にGPR88発現ベクターを導入する方法としては、宿主細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。宿主細胞としては、酵母、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞等を用いることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターを挙げるることができる。

宿主細胞としては、例えば、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイペロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株を挙げることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等を挙げるができる。またGPCRの発現に適した変異株を用いることもできる [Trends in Biotechnology, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (1995)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)]。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等を挙げるができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA3.1(+), pCDM8, pAGE107, pREP4, pAGE103, pAMo, pAMoA, pAS3-3等を例示することができる。特に誘導発現用のベクター、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*由来の転写因子Gal4のDNA結合領域とエストロゲン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質 (Gal4-ER) [Cell, 54, 199 (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1657 (1993)] を発現する宿主細胞に導入した場合に、 17β -エストラジオールの添加により発現誘導が可能となるpAGal9-dおよびpAGal9-nd等が好ましい。また、複製開始点として、エプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有するpAMo, pAMoA, pAGal9-d, pAGal9-nd等のベクターは、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞等のエプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現するB細胞株を宿主細胞としたときに、染色体外にプラスミド状態で安定に存在するため、高い発現を示す形質転換株を容易に得ることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニーネズミ白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート・プロモーター (Long Terminal Repeat Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、例えば、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ヒト大腸癌細胞株、カエルの卵母細胞およびカエルのメラニン細胞等を挙げることができる。

具体的には、マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NSO等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等を挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等を挙げることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、GPR88を発現する形質転換体を得ることができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入

して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（すべてインビトロジェン社製）等を挙げるができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヤガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh 5（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyxmori* N4等を挙げるができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413 (1987)〕等を挙げるができる。また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法、例えば、エレクトロポレーション法〔*Cytotechnology*, **3**, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413 (1987)〕等を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもできる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、公知の方法〔組織培養, **20** (1994)、組織培養, **21** (1995)、*Trends in Biotechnology*, **15**, 45(1997)〕に準じてGPR88を発現する形質転換体を得ることができる。

このとき用いられるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等を挙げるができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率を挙げることもできる。

このとき用いられる宿主細胞としては、例えば、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等を挙げることができる。

このとき用いられる組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)（特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977）、エレクトロポレーション法〔*Cytotechnology*, **3**, 133 (1990)、特開昭60-251887〕、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（特許第2606856号、特許第2517813号）等を挙げることができる。

細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトール

ルリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質（例えば、CREB、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6、MAPK、ATF-2、c-Jun、c-fos、 $I\kappa$ -B α 、 $I\kappa$ -B β 、Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8等）のリン酸化、c-fos活性化、pHの変動、細胞増殖活性、あるいはレポーター遺伝子やマーカー遺伝子の発現量があげられ、これらを調べることにより細胞の応答を測定することができる[J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、Science, 268, 98 (1995)、J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、J. Recept. Signal Transduct. Res., 17, 57 (1997)、Endocrinology 138, 1400 (1997)、Endocrinology 138, 1471 (1997)、Nat. Biotechnol., 16, 1334 (1998)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471 (1998)、Br. J. Pharmacol., 125, 1387 (1998)、Trends Biotechnol., 15, 487 (1997)、Anal. Biochem., 252, 115 (1997)、Nature, 358, 325 (1992)、Nature, 393, 272 (1998)、Cell, 92, 573 (1998)、J. Biol. Chem., 272, 27497 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 20, 370 (1999)、WO98/46995]。

レポーター系を用いて細胞の応答をモニターする場合は、例えば、GPR88を発現させた細胞に、GPR88の活性化により発現が誘導されるような適当な転写因子の結合配列と基本プロモーターからなる人工プロモーター配列の下流に適当なレポーター遺伝子を連結したDNAを導入することにより、GPR88の活性化をレポーター遺伝子の発現で測定することができる。転写因子の結合配列としては、 G_s と共役するGPCRの活性化に伴い転写を活性化するCRE (cAMP responsive element)、 G_q と共役するGPCRの活性化に伴い転写を活性化するTRE (TPA responsive element)、 G_i と共役するGPCRの活性化に伴い転写を活性化するSRE (serum responsive element) 等が利用できる。また、 $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ および $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸にそれぞれ置換したキメラ $G\alpha_s$ をGPR88の発現細胞に発現させることにより、GPR88が共役するG蛋白質の種類が不明で G_s 、 G_i 、 G_q のいずれであっても、GPR88の活性化に伴いCREを含む人工プロモーターからのレポーター遺伝子の発現が誘導される。

レポーター遺伝子としては、あらゆるレポーター遺伝子を使用可能であるが、例えば、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子等が利用できる。

本発明で予防および/または治療される中枢疾患としては、例えば脳内におけるGPR88の発現部位との関連が知られている疾患が挙げられ、具体的にはパーキンソン病、うつ病、不安、精神分裂病、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、脊髄小脳変性症、脳卒中、不随意運動、注意欠陥障害、錐体外路症状、薬物中毒、アルコール中毒、時差ぼけ等が挙げられる。

本発明において、GPR88の機能抑制剤は、その性質のひとつとしてGPR88の機能抑制作用を有している物質を有効成分として含有していればよく、その物質の構造は特に限定されない。GPR88の機能抑制作用を有する物質としては例えば、GPR88拮抗作用を有する化合物（例えば、インバースアゴニスト、アンタゴニスト）、抗体（例えば、中和抗体等）、アンチセンスオリゴヌクレオチド等の、GPR88

の発現を低下させる物質、GPR88とG蛋白質とのカップリングを阻害するもの等シグナル伝達を阻害する物質等が挙げられる。

本発明で用いられるGPR88遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、配列番号1、3または5の塩基配列の連続する10塩基以上、好ましくは10～40塩基、より好ましくは15～30塩基の配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、GPR88遺伝子の発現を特異的に抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。特にヒトGPR88 cDNAの配列である配列番号1の塩基配列の連続する10塩基以上、好ましくは10～40塩基、より好ましくは15～30塩基の配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましい。GPR88遺伝子の発現を抑制し得る作用を有するためには、翻訳開始点（配列番号1に示す塩基配列の438番目の塩基に相当する）を含む領域あるいは翻訳開始点近傍の領域と相補的な配列を含む塩基配列からなるオリゴヌクレオチドが好ましい。実質的に相補的な塩基配列とは、配列番号1、3または5の塩基配列の連続する10～40塩基の配列と90%以上の相同性を有し、配列番号1の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするような塩基配列をいう。ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基は例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、公知のDNA合成装置、WO93/20095、WO02/10185に記載の方法等を用いて製造することができる。

本発明で用いられるGPR88に対する抗体は、以下のようにして作製することができる。

GPR88ポリペプチドまたは部分ペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。該抗原を投与する動物としては、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を挙げることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。抗原としてペプチドを用いる場合は、ペプチドをキーホール・リンペット・ヘモシアニンや牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを用いることができる。GPR88ポリペプチドは、上記のGPR88を発現する細胞から、通常の蛋白質の精製法により得ることができる。また、GPR88を発現する細胞あるいは、その膜画分を抗原とすることもできる。GPR88の部分ペプチドは、ペプチド合成機によって合成することができる。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法：医学書院刊（1976年）、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory（1988）〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した上記動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法が挙げられる。

さらに、GPR88に対するモノクローナル抗体を以下のようにして作製することができる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した上記動物に抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリスリン酸-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1 [Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8 [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI 1640培地に1.5 mmol/L グルタミン、50 μ mol/L 2-メルカプトエタノール、10 μ g/mL ゲンタマイシンおよび10% ウシ胎児血清を加えた培地（以下、正常培地という）に、さらに15 μ g/mL 8-アザグアニンを加えた培地] で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

上記の抗体産生細胞と骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS（1.83g/Lリン酸二ナトリウム、0.21g/Lリン酸一カリウム、7.65g/L NaCl、pH7.2）でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞＝5～10：1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 2g、MEM培地 2mLおよびジメチルスルホキシド0.7mLを混合した溶液を0.2～1mL添加し、更に1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50mLになるように調製する。

該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地に0.1 mmol/L ヒポキサンチン、15 μ mol/L チミジンおよび0.4 μ mol/L アミノプテリンを加えた培地] 100mL中に懸濁する。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに100 μ L/ウェルずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりAntibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)等に記載されている酵素免疫測定法により、免疫に用いた抗原に特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法を挙げることができる。免疫の際、抗原に用いたGPR88ポリペプチドまたはGPR88の部分ペプチドをプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清を第一抗体として反応させる。さらに第二抗体としてペルオキシダーゼ等の酵素で標識した抗イムノグロブリン抗体（免疫の

際、抗原を投与した動物のイムノグロブリンに対する抗体、例えばマウスを免疫した場合は抗マウスイムノグロブリン抗体を用いる)を反応させた後に、酵素により発色する試薬を添加して反応を行ない、その培養上清が特異的に反応したものをGPR88に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

選択したハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものをGPR88に対する抗体の産生ハイブリドーマ株として選択する。

プリスタン（2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン）0.5mLを腹腔内投与し、2週間飼育した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、取得したGPR88に対する抗体の産生ハイブリドーマ株5～20×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナル抗体の作製で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

以上のようにして得られた、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を試験物質として、上記のGPR88の構成活性阻害物質のスクリーニング法を行い、該抗体から、GPR88の構成活性を抑制する抗体を選択することができる。

後述の試験例2および3に記載されているように、GPR88遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与によりドパミン受容体拮抗薬により誘発される運動不全状態の改善、レセルピン投与により誘発される中枢機能不全状態の改善が認められたことから、GPR88の機能を抑制する化合物もしくはその塩またはGPR88の機能を抑制するGPR88に対する抗体も同様の作用を示すと考えられる。したがって、GPR88遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、GPR88の機能を抑制する化合物もしくはその塩またはGPR88の機能を抑制するGPR88に対する抗体を含有する医薬は、ドパミン神経系の異常に基づく疾患、およびカテコールアミン神経系の異常に基づく疾患、例えば、パーキンソン病、不随意運動、錐体外路症、ハンチントン舞蹈病、脊髄小脳変性症、脳卒中等の運動障害を伴う疾患の予防および/または治療剤として使用することができる。またうつ病、精神分裂病、不安、アルツハイマー病、注意欠陥障害、薬物中毒、アルコール中毒等の精神症状を改善する作用も期待できる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する医薬は、GPR88 mRNAの一部、好ましくは翻訳開始点を含む領域あるいはその近傍の領域に相補的な配列を有し、GPR88遺伝子の発現を抑制することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、低毒性であり、生体内におけるGPR88の機能を抑制することができるので、例えば、パーキンソン病、不随意運動、錐体外路症、ハンチントン舞蹈病、脊髄小脳変性症、脳卒中等の運動障害を伴う疾患の予防および/または治療剤として使用することができる。またうつ病、精神分裂病、不安、アルツハイマー病、注意欠陥障害、薬物中毒、アルコール中毒等の精神症状の予防および/または治療剤として使用することができる。上記アンチセンスヌクレオチドを上記の予防および/または治療剤として使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、

投与することができる。例えば、該アンチセンスヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、サル、イヌ、ウシ、ネコ等）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やカテーテルによっても投与できる。また、脳室内、あるいは側座核、小脳のオリブ核または線条体内注入によっても投与できる。

GPR88の機能抑制作用を有する化合物としては、例えば式 (I) および (IA) で表される化合物が挙げられる。以下、式 (I) および (IA) で表される化合物をそれぞれ化合物 (I) および (IA) という。他の式番号の化合物についても同様である。

化合物 (I) および化合物 (IA) の各基の定義において、以下の例示が挙げられる。

- (i) 低級アルキル、低級アルコキシおよび低級アルキルチオの低級アルキル部分としては、例えば直鎖または分岐状の炭素数1~10のアルキルが挙げられ、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、1,5-ジメチルヘキシル、イソオクチル、ノニル、デシル等が挙げられる。
- (ii) シクロアルキルおよびシクロアルキルアルキルのシクロアルキル部分としては、例えば炭素数3~8のシクロアルキルが挙げられ、具体的にはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等が挙げられる。
- (iii) 低級アルケニルとしては、例えば直鎖、分岐または環状の炭素数2~8のアルケニルが挙げられ、具体的にはビニル、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、シクロヘキセニル、2,6-オクタジエニル等が挙げられる。
- (iv) 低級アルキニルとしては、例えば直鎖または分岐状の炭素数2~8のアルキニルが挙げられ、具体的にはエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル等が挙げられる。
- (v) ハロゲンとは、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素の各原子を表す。
- (vi) アリール、アリールオキシおよびアリールオキシアルキルのアリール部分としては、例えば炭素数6~14の単環式、二環式または三環式のアリールが挙げられ、具体的にはフェニル、ナフチル、インデニル、アントラニル等が挙げられる。
- (vii) アラルキル、複素環アルキル、シクロアルキルアルキル、ヒドロキシ低級アルキル、カルボキシ低級アルキルおよびアリールオキシアルキルのアルキレン部分ならびにアラルキルオキシアルキルの2つのアルキレン部分は、前記低級アルキル(i)の定義で挙げた基から水素を一つ除いたものと同義である。アラルキルオキシアルキルの2つのアルキレン部分は、同一でも異なってもよい。
- (viii) アラルキルおよびアラルキルオキシアルキルのアリール部分としては、前記アリール(vi)の定義で挙げた基に加え、例えば前記アリール(vi)の定義で挙げた基

がシクロアルキルと縮合した多環性縮合環基が挙げられ、具体的にはインダニル、1,2,3,4-テトラヒドロナフチル、6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプチル等が挙げられる。

(ix)複素環基および複素環アルキルの複素環基部分としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む5員または6員の単環性複素環基、3~8員の環が縮合した二環または三環式であって窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む縮環性複素環基等が挙げられ、具体的にはピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、2-オキシベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、プリニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾジオキサゾリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、ナフチルリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、ピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チエニル、フリル、ピロリジニル、2,5-ジオキサピロリジニル、チアゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、ホモピペラジニル、ホモピペリジル、ホモピペリジノ、モルホリニル、モルホリノ、チオモルホリニル、チオモルホリノ、ピラニル、テトラヒドロピリジル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、インドリニル、2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシニル等が挙げられる。

(x)隣接する窒素原子と一緒に形成される複素環基としては、例えば少なくとも1個の窒素原子を含む5員または6員の単環性複素環基（該単環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい）、3~8員の環が縮合した二環または三環式で少なくとも1個の窒素原子を含む縮環性複素環基（該縮環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい）等が挙げられ、具体的にはピリジル、テトラヒドロピリジル、インドリニル、イソインドリニル、ピロリジニル、チアゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジノ、ホモピペリジノ、ピペラジニル、ホモピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、ペルヒドロアゼピニル、ペルヒドロアゾシニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、デカヒドロイソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、プリニル、ジヒドロインドリル、ピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル等が挙げられる。

(xi)ハロゲン化低級アルキルは、ハロゲン（該ハロゲンは、前記ハロゲン(v)と同義である）で置換された低級アルキル（該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である）を意味し、置換基であるハロゲンは同一または異なって例えば置換数1~3である。

(xii)置換低級アルキル、置換低級アルコキシおよび置換低級アルキルチオにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換数1~3の、低級アルカノイル、低級アルコキシ、アリールオキシ、置換アリールオキシ、アラルキルオキシ、置換アラルキルオキシ、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、ハ

ロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルキルチオ、モノまたはジ低級アルキルアミノ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルカノイルアミノ、(低級アルカノイル)(低級アルキル)アミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニル、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシ等が挙げられる。

ここで示した置換アリールオキシおよび置換アラルキルオキシにおける置換基(xiii)としては、同一または異なって、例えば置換数1~3の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、アリール、複素環基、オキソ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等が挙げられ、低級アルキル、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分、アリール、複素環基は、それぞれ前記低級アルキル(i)、アリール(vi)、複素環基(ix)と同義であり、ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義である。

また、ここで示したアリールオキシおよびアラルキルオキシのアリール部分、ハロゲンならびに低級アルカノイル、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルチオ、モノまたはジ低級アルキルアミノ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルカノイルアミノ、(低級アルカノイル)(低級アルキル)アミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルおよびモノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシの低級アルキル部分は、それぞれ前記アリール(vi)、ハロゲン(v)および低級アルキル(i)と同義であり、アラルキルオキシのアルキレン部分は、前記アラルキルのアルキレン部分(vii)と同義である。

また、ここで示したジ低級アルキルアミノ、(低級アルカノイル)(低級アルキル)アミノ、ジ低級アルキルアミノカルボニルおよびジ低級アルキルアミノカルボニルオキシにおける2つの低級アルキル部分は、同一でも異なってもよい。(xiv)置換アリール、置換アラルキル、置換シクロアルキル、置換シクロアルキルアルキル、置換低級アルケニル、置換低級アルキニル、置換アリールオキシ、置換複素環基、置換複素環アルキル、置換アリールオキシアルキル、置換アラルキルオキシアルキル、置換ピペラジニルおよび隣接する窒素原子と一緒に形成される置換複素環基における置換基としては、前記置換低級アルキルにおける置換基(xii)の定義で挙げた基に加え、例えば低級アルキル、置換低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、アリールカルボニル、置換アリールカルボニル、複素環基、置換複素環基、複素環アルキル、置換複素環アルキル、エチレンジオキシ等が挙げられる。

ここで示した置換低級アルキル、置換シクロアルキル、置換アリール、置換アラルキル、置換アリールカルボニル、置換複素環基および置換複素環アルキルにおける置換基は、前記置換アリールオキシおよび置換アラルキルオキシにおける置換基(xiii)と同義である。

また、ここで示した低級アルキル、シクロアルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリールおよびアリールカルボニルのアリール部分、複素環基および複素環アルキルの複素環基部分、アラルキルおよび複素環アルキルのアルキレン部分ならびにアラルキルのアリール部分は、それぞれ前記低級アルキル(i)、シク

ロアルキル(ii)、低級アルケニル(iii)、低級アルキニル(iv)、アリール(vi)、複素環基(ix)、アラルキルのアルキレン部分(vii)およびアラルキルのアリール部分(viii)と同義である。

(xv)置換ヒドロキシメチルの置換基としては、同一または異なって、例えば置換数1または2の低級アルキル等が挙げられる。

ここで示した低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である。

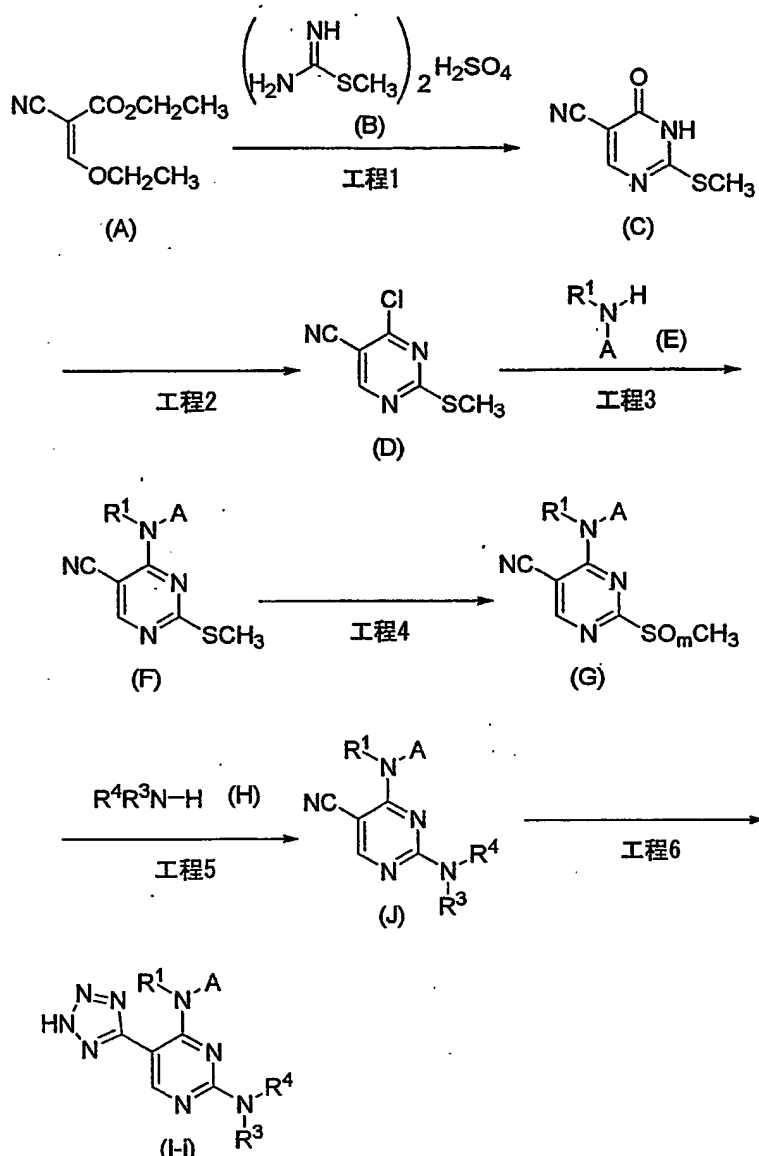
化合物 (I) および化合物 (IA) の薬理学的に許容される塩としては、毒性のない、水溶性のものが好ましく、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩等の酸付加塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等の金属塩、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等のアンモニウム塩、モルホリン付加塩、ピペリジン付加塩等の有機アミン付加塩、グリシン付加塩、フェニルアラニン付加塩、リジン付加塩、アスパラギン酸付加塩、グルタミン酸付加塩等のアミノ酸付加塩等が挙げられる。

次に化合物 (I) の製造法について説明する。

なお、以下に示した製造法において、定義した基が反応条件下変化するか、または方法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される方法、例えば官能基の保護、脱保護等〔例えば、プロテクティブ・グループ・イン・オーガニック・シンセシス第三版 (Protective Groups in Organic Synthesis, the third edition)、グリーン (T. W. Greene)、ワッツ (Peter G. M. Wuts) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレーティッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999年)〕の手段に付すことにより容易に製造を実施することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

化合物 (I) のうちYが水素原子であり、Xが1,2,3,4-テトラゾール-5-イルであり、R²が-NR³R⁴ (式中、R³およびR⁴はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (I-i) は、例えば以下に示す製造法1によって得ることができる。

製造法 1 :



(式中、A、 R^1 、 R^3 および R^4 はそれぞれ前記と同義であり、 m は1または2を表す)

【工程1】

2-エトキシメチレン-2-シアノ酢酸エチル〔化合物 (A)〕を、溶媒中、アルカリ存在下、0.5当量～大過剰量、好ましくは0.5当量～2当量の硫酸メチルイソチオ尿素〔化合物 (B)〕と反応させることにより、化合物 (C)を得ることができる。

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、2-プロパノール、テトラヒドロフラン、ジオキサン等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもエタノールが好ましい。

アルカリとしては、例えば水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム

ム、水酸化マグネシウムまたは水酸化カルシウム等のアルカリ水溶液、カリウム *tert*-ブトキシドの水溶液、テトラヒドロフラン溶液もしくは2-メチル-2-プロパノール溶液、ナトリウムメトキシドの水溶液もしくはメタノール溶液等を用いることができ、中でも水酸化ナトリウム水溶液が好ましい。

反応は、0℃～50℃の間の温度、好ましくは0℃～15℃の間の温度で行われ、通常1時間～48時間で終了する。

[工程2]

工程1で得られる化合物 (C) を、反応に不活性な溶媒中または無溶媒で、1当量～大過剰量の塩基の存在下または非存在下、1当量～大過剰量の塩素化剤と反応させることにより化合物 (D) を得ることができる。

塩素化剤としては、例えばオキシ塩化リン等が用いられる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えば1,2-ジクロロエタン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、クロロホルム、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル等を単独でまたはそれらを混合して用いることができる。塩基としては、例えばトリエチルアミン、ピリジン、*N,N*-ジメチルアニリン等が挙げられる。

反応は、0℃～溶媒の沸点の間の温度、好ましくは50℃～溶媒の沸点の間の温度で行われ、通常1時間～48時間で終了する。

なお、本工程で得られる化合物 (D) は上記の方法以外に、ジャーナル・オブ・ヘテロサイクリック・ケミストリー (J. Heterocycl. Chem.)、8(3)巻、445頁 (1971年)、WO99/61444等に記載の方法でまたはそれらに準じた方法によっても得ることができる。

[工程3]

工程2で得られる化合物 (D) を、無溶媒または反応に不活性な溶媒中、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～3当量の化合物 (E) と反応させることにより、化合物(F)を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばテトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもテトラヒドロフラン、クロロホルムまたはそれらの混合溶媒が好ましい。

反応は、0℃～100℃の間の温度、好ましくは0℃～50℃の間の温度で行われ、通常10分間～48時間で終了する。

また、この反応は必要に応じて、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～10当量の塩基を添加して行ってもよい。

塩基としては、例えばトリエチルアミン、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-ウンデカ-7-エン (DBU)、*N,N*-ジメチルアニリン、ピリジン、キノリン等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、カリウム *tert*-ブトキシド等の無機塩基、アンバーリストA-21 (ロームアンドハース

社製)、AG 1-X8 (バイオラッド社製) 等の塩基性アニオン交換レジン、ポリビニルピリジン、モルホリノメチルポリスチレン等の固相に担持された塩基等を用いることができ、並列合成法 (コンビナトリアル・ケミストリー) で反応を行う場合には、中でもモルホリノメチルポリスチレンが好ましい。

化合物(E)は、市販品としてまたはコンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ第二版 (Comprehensive Organic Transformations, the second edition)、ラロック (R. C. Larock) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999年) 等に記載の方法に準じて得ることができる。

[工程 4]

工程 3 で得られる化合物 (F) を、反応に不活性な溶媒中、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～5当量の酸化剤で処理することにより、化合物 (G) を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、水等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもジクロロメタンが好ましい。

酸化剤としては、例えばメタクロ濾過安息香酸、過酸化ベンゾイル、過酢酸、過酸化水素水、過ヨウ素酸ナトリウム等を用いることができ、中でもメタクロ濾過安息香酸が好ましい。

反応は0℃～100℃の間の温度、好ましくは0℃～50℃の間の温度で行われ、通常10分間～24時間で終了する。

なお、化合物 (G) において、 m が1である化合物と m が2である化合物は、それぞれ例えば酸化剤の当量数、反応の温度等の条件等を調節することにより得られ、それらが混在することもある。混在する場合、その比率は特に限定されず、いずれの場合もそのまま次工程に使用することができる。

[工程 5]

工程 4 で得られる化合物 (G) を、無溶媒または反応に不活性な溶媒中、1当量～大過剰量の、好ましくは1当量～5当量の化合物 (H) と反応させることにより、化合物 (J) を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもテトラヒドロフランが好ましい。

反応は0℃～100℃の間の温度、好ましくは20℃～60℃の間の温度で行われ、通常1時間～72時間で終了する。

化合物 (H) は、市販品としてまたはコンプリヘンシブ・オーガニック・トラン

スフォーメーションズ第二版 (Comprehensive Organic Transformations, the second edition)、ラロック (R. C. Larock) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999年) 等に記載の方法に準じて得ることができる。

[工程6]

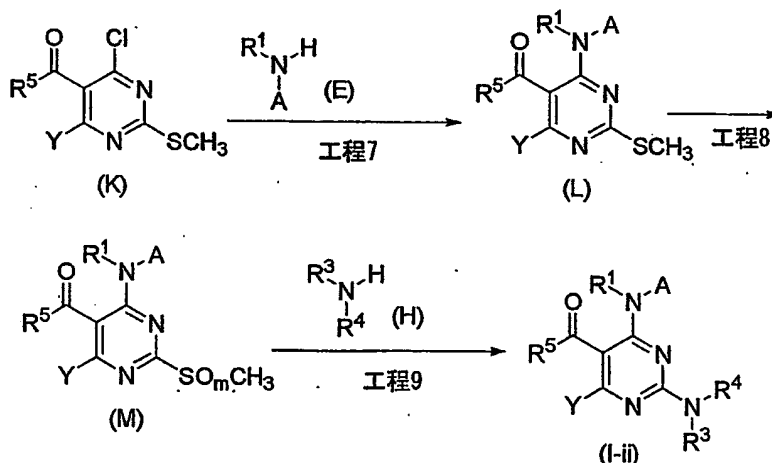
工程5で得られる化合物 (J) を、反応に不活性な溶媒中、1当量～10当量のアジ化ナトリウムまたはアジ化アンモニウムと反応させることにより、化合物 (I-i) を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばクロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもN,N-ジメチルホルムアミドが好ましい。また、反応を加速する目的で、反応系中へ塩化アンモニウム、塩化エチルアンモニウム等を1当量～大過剰量、好ましくは1当量～10当量添加することもできる。

反応は0℃～180℃の間の温度、好ましくは50℃～120℃の間の温度で行われ、通常1時間～72時間で終了する。

化合物 (I) のうち、Xが-C(=O)R⁵であり、R²が-NR³R⁴ (式中、R³およびR⁴はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (I-ii) は、例えば以下に示す製造法2によって得ることができる。

製造法2：



(式中、A、R¹、R³、R⁴、R⁵、Yおよびmはそれぞれ前記と同義である。)

[工程7]

化合物 (K) を、無溶媒または反応に不活性な溶媒中、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～3当量の化合物 (E) と反応させることにより、化合物 (L) を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばテトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、

ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもテトラヒドロフラン、クロロホルム、1,2-ジメトキシエタンまたはそれらの混合溶媒が好ましい。

反応は、0℃～150℃の間の温度、好ましくは50℃～120℃の間の温度で行われ、通常1時間～96時間で終了する。

また、この反応は必要に応じて、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～10当量の塩基を添加して行ってもよい。

塩基としては、例えばトリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、DBU、N,N-ジメチルアニリン、ピリジン、キノリン等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、カリウムtert-ブトキシド等の無機塩基、アンバーリストA-21（ローマアンドハース社製）、AG 1-X8（バイオラッド社製）等の塩基性アニオン交換レジン、ポリビニルピリジン、モルホリノメチルポリスチレン等の固相に担持された塩基等を用いることができ、中でもトリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミンまたはDBUが好ましい。

化合物(E)は、市販品としてまたはコンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ第二版(Comprehensive Organic Transformations, the second edition)、ラロック(R. C. Larock)著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド(John Wiley & Sons Inc.) (1999年)等に記載の方法に準じて得ることができる。

化合物(K)は、市販品としてまたは例えばWO00/76980、WO00/27826、WO01/83460、WO97/09315、特開2001-89452号公報、WO99/31073等に記載の方法に準じて得ることができる。

[工程8]

工程7で得られる化合物(L)を、反応に不活性な溶媒中、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～5当量の酸化剤で処理することにより、化合物(M)を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、水等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもジクロロメタンが好ましい。

酸化剤としては、例えばメタクロ濾過安息香酸、過酸化ベンゾイル、過酢酸、過酸化水素水、過ヨウ素酸ナトリウム等を用いることができ、中でもメタクロ濾過安息香酸が好ましい。

反応は0℃～100℃の間の温度、好ましくは0℃～50℃の間の温度で行われ、通常10分間～24時間で終了する。

なお、化合物(M)において、mが1である化合物とmが2である化合物は、それ

それ例えば酸化剤の当量数、反応の温度等の条件等を調節することにより得られ、それらが混在することもある。混在する場合、その比率は特に限定されず、いずれの場合もそのまま次工程に使用することができる。

[工程 9]

工程 8 で得られる化合物 (M) を、反応に不活性な溶媒中、1 当量～5 当量の化合物 (H) と反応させることにより、化合物 (I-ii) を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもテトラヒドロフランまたは1,2-ジメトキシエタンが好ましい。

反応は20℃～150℃の間の温度、好ましくは50℃～120℃の間の温度で行われ、通常1時間～7日間で終了する。

化合物(H)は、市販品としてまたはコンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ第二版 (Comprehensive Organic Transformations, the second edition)、ラロック (R. C. Larock) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999年) 等に記載の方法に準じて得ることができる。

また、化合物 (I-ii) のうち、R⁵がヒドロキシである化合物 (I-iiib) は、化合物 (I-ii) のうち、R⁵がR^{5a} (式中、R^{5a}はR⁵の定義のうち置換もしくは非置換の低級アルコキシを表す) である化合物 (I-iiia) から、以下に示す工程 10 によっても得ることができる。

[工程 10]



(式中、R¹、A、R³、R⁴、R^{5a}およびYはそれぞれ前記と同義である)

工程 9 で得られる化合物 (I-iiia) を、溶媒中、1 当量～10 当量、好ましくは1 当量～5 当量の塩基で処理することにより、化合物 (I-iiib) を得ることができる。

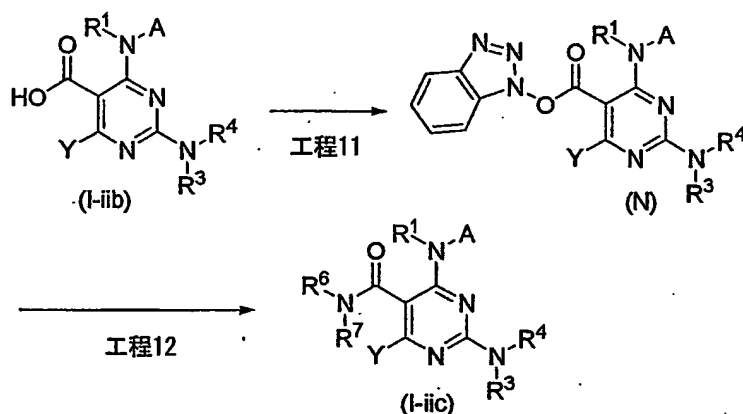
溶媒は、特に限定されないが、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のプロトン性溶媒と水との混合溶媒、またはテトラヒドロフラン、ジオキサン等の非プロトン性溶媒と水との混合溶媒があげられ、これらを混合して用いることもでき、中でもエタノールと水の混合溶媒が好ましい。

塩基としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸リチウム等の無機塩基、アンバーリストA-21 (ロームアンドハース社製)、AG 1-X8 (バイオラッド社製) 等の塩基性アニオン交換レジン等を用いることができる。

反応は0℃～150℃の間の温度、好ましくは20℃～100℃の間の温度で行われ、通常1時間～48時間で終了する。

また、化合物 (I-ii) のうち、R⁵が-NR⁶R⁷である化合物 (I-ii c) は、例えば以下に示す製造法 3 によっても得ることができる。

製造法 3 :



(式中、R¹、A、R³、R⁴、R⁶、R⁷およびYはそれぞれ前記と同義である)

[工程 1 1]

製造法 2 の工程 1 0 で得られる化合物 (I-ii b) を、反応に不活性な溶媒中、1当量～10当量の縮合剤の存在下、1当量～5当量、好ましくは1当量～3当量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾールと反応させることにより、化合物 (N) を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、水等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもクロロホルム、テトラヒドロフランまたはそれらの混合溶媒が好ましい。

縮合剤としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドまたはその塩酸塩、ポリスチレンに担持されたN-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド、ポリスチレンに担持されたN-ベンジル-N'-シクロヘキシルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン化物塩、ジフェニルホスホリルアジド等を用いることができ、中でもN-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドまたはその塩酸塩またはポリスチレンに担持されたN-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドが好ましい。

反応は0℃～100℃の間の温度、好ましくは0℃～60℃の間の温度で行われ、通常1時間～120時間で終了する。

[工程 1 2]

工程 1 1 で得られる化合物 (N) を無溶媒または反応に不活性な溶媒中、

1当量～大過剰量、好ましくは1当量～5当量の HNR^6R^7 （式中、 R^6 および R^7 はそれぞれ前記と同義である）と反応させることにより、化合物（I-iiic）を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばテトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、水等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもテトラヒドロフランと水の混合溶媒が好ましい。

反応は 0°C ～ 100°C の間の温度、好ましくは 20°C ～ 60°C の間の温度で行われ、通常1時間～96時間で終了する。

また、この反応は必要に応じて、1当量～10当量、好ましくは1当量～5当量の塩基を添加して行ってもよい。

塩基としては、例えばトリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、DBU、N,N-ジメチルアニリン、ピリジン、キノリン等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、カリウムtert-ブトキシド等の無機塩基、アンバーリストA-21（ロームアンドハース社製）、AG 1-X8（パイオラッド社製）等の塩基性アニオン交換レジン、ポリビニルピリジン、モルホリノメチルポリスチレン等の固相に担持された塩基等を用いることができ、中でも炭酸カリウムまたはDBUが好ましい。

[工程13]

また、製造法3で得られる化合物（I-iiic）のうち、 R^7 にカルボキシ低級アルキル（該カルボキシ低級アルキルは前記と同義である）を有する化合物（I-iiica）は、製造法2の工程10と同様にして、化合物（I-iiic）のうち、 R^7 に低級アルコキシカルボニル低級アルキル（該低級アルコキシカルボニル低級アルキルは前記と同義である）を有する化合物（I-iiicb）を、加水分解処理することによっても得ることができる。

また、化合物（I-iiicb）のうち、低級アルコキシカルボニル低級アルキルの低級アルコキシ部分がtert-ブトキシである化合物（I-iiicc）を、溶媒中、1当量～大過剰量の酸で処理することにより化合物（I-iiica）を得ることもできる。

溶媒としては、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、水等を単独でまたは混合して用いることができ、中でもジクロロメタンが好ましい。

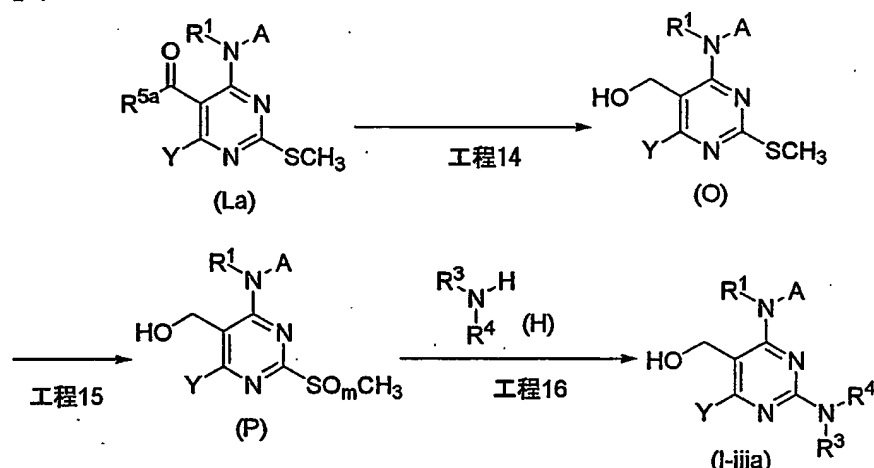
酸としては、例えばトリフルオロ酢酸等のカルボン酸、塩酸等の鉱酸、トリフルオロメタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸等のスルホン酸等を用いることができ、中でもトリフルオロ酢酸が好ましい。

反応は 0°C ～ 150°C の間の温度、好ましくは 0°C ～ 50°C の間の温度で行われ、通

常1時間～48時間で終了する。

化合物 (I) のうち、Xがヒドロキシメチルであり、R²が-NR³R⁴ (式中、R³およびR⁴はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (I-iii) は、例えば以下に示す製造法4によって得ることができる。

製造法4：



(式中、A、m、R¹、R³、R⁴、R^{5a}およびYはそれぞれ前記と同義である)

[工程14]

製造法2の工程7で得られる化合物(L)のうち、R⁵がR^{5a} (式中、R^{5a}は前記と同義である) である化合物(La)を、反応に不活性な溶媒中、2当量～10当量、好ましくは2当量～6当量の還元剤で処理することにより、化合物(O)を得ることができる。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン、ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン等を単独でまたはそれらを混合して用いることができる。

還元剤としては、例えば水素化リチウムアルミニウム、水素化ジイソブチルアルミニウム等を用いることができ、中でも水素化リチウムアルミニウムが好ましい。

反応は-78℃～溶媒の沸点の間の温度、好ましくは0℃～50℃の間の温度で行われ、通常1分間～10時間で終了する。

[工程15]

製造法1の工程4に示した方法と同様にして、工程14で得られた化合物(O)を、反応に不活性な溶媒中、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～5当量の酸化剤で処理することにより、化合物(P)を得ることができる。

溶媒、酸化剤、反応温度、反応時間等の各種条件は工程4に記載の条件と同様である。

[工程16]

工程15で得られる化合物(P)を、無溶媒または反応に不活性な溶媒中、1当量～大過剰量、好ましくは1当量～10当量の塩基の存在下または非存在下、

1当量～5当量の化合物(H)と反応させることにより、化合物(I-iiiia)を得ることができる。

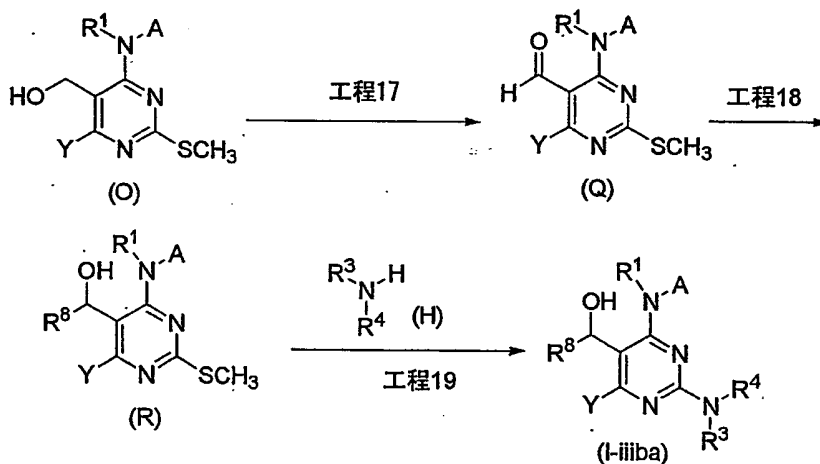
反応に不活性な溶媒は、反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもジオキサンまたは1, 2-ジメトキシエタンが好ましい。

塩基としては、例えばトリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、モルホリノメチルポリスチレン等の固相に担持された塩基等を用いることができ、中でもN,N-ジイソプロピルエチルアミンが好ましい。

反応は20℃～150℃の間の温度、好ましくは80℃～120℃の間の温度で行われ、通常1時間～96時間で終了する。

化合物 (I) のうちXが置換ヒドロキシメチルであり、R²が-NR³R⁴ (式中、R³およびR⁴はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (I-iiiiba) は、例えば以下に示す製造法5によって得ることができる。

製造法5：



(式中、A、R¹、R³、R⁴およびYはそれぞれ前記と同義であり、R⁸は低級アルキルを表し、該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である)

【工程17】

製造法4の工程14で得られる化合物(O)を溶媒中、酸化剤で処理することにより、化合物(Q)を得ることができる。

酸化剤としては、アルコールの酸化反応に用いられる各種試薬を任意に用いることができ、例えば二酸化マンガ、クロクロム酸ピリジニウム(PCC)、二クロム酸ピリジニウム(PDC)、酸化クロム(IV)ニピリジン錯体、重クロム酸カリウム、重クロム酸ナトリウム、硝酸セリウム(IV)アンモニウム等が挙げられるが、中でも二酸化マンガが好ましい。

溶媒は反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例

例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ジイソプロピルエーテル、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、アセトニトリル、ピリジン、水等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもクロロホルムが好ましい。

反応は、 -78°C ～溶媒の沸点の間の温度、好ましくは 0°C ～ 50°C の間の温度で行われ、通常1時間～96時間で終了する。

[工程 18]

工程 17 で得られる化合物 (Q) を、反応に不活性な溶媒中、1当量～5当量、好ましくは2当量～3当量の対応するアルキル化剤と反応させることにより、化合物 (R) を得ることができる。

対応するアルキル化剤としては、例えば R^8MgBr (式中、 R^8 は前記と同義である)、 R^8Li (式中、 R^8 は前記と同義である) 等が用いられる。より具体的には、 R^8 がメチルの場合、例えば臭化メチルマグネシウム、メチルリチウム等を用いることができ、中でも臭化メチルマグネシウムが好ましい。

反応に不活性な溶媒は、反応に不活性であればいずれでもよく、例えば、テトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン、ジイソプロピルエーテル等を単独でまたはそれらを混合して用いることができ、中でもテトラヒドロフランが好ましい。

反応は -78°C ～溶媒の沸点の間の温度、好ましくは -40°C ～ 20°C の間の温度で行われ、通常1時間～96時間で終了する。

[工程 19]

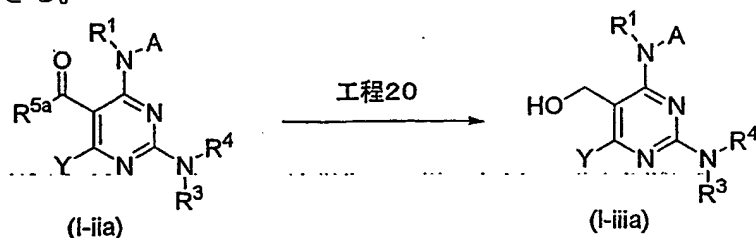
工程 18 で得られる化合物 (R) から、製造法 4 の工程 15 および工程 16 と同様に、化合物 (I-iiib) のうち、 X^{A} がモノ置換ヒドロキシメチルである化合物 (I-iiiba) を得ることができる。

[工程 20]

また、化合物 (I-iiib) のうち、 X^{A} がジ置換ヒドロキシメチルである化合物 (I-iiibb) は、工程 18 で得られる化合物から、工程 17、工程 18 次いで工程 19 と同様に処理することにより得ることができる。

製造法 6 :

製造法 4 に記載した方法に加え、下記の製造法に従っても化合物 (I-iiia) を得ることができる。



(式中、A、 R^1 、 R^3 、 R^4 、 R^{5a} およびYはそれぞれ前記と同義である)

[工程 21]

製造法 2 の工程 9 で得られる化合物 (I-iiia) を、溶媒中、1 当量～10 当量、好

ましくは 1.5 当量～3 当量の還元剤で処理することにより、化合物 (I-iiia) を得ることができる。

溶媒は反応に不活性なものであればいずれでもよく、特に限定されないが、例えばペンタン、ヘキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン、ジオキサン等を単独でまたはそれらを混合して用いることができる。

還元剤としては、例えば水素化リチウムアルミニウム、水素化ジイソブチルアルミニウム、水素化ビス (メトキシエトキシ) アルミニウム等を用いることができ、中でも水素化ビス (メトキシエトキシ) アルミニウムが好ましい。

反応は -78℃～溶媒の沸点の間の温度、好ましくは 0℃～30℃の間の温度で行われ、通常 10 時間～24 時間で終了する。

製造法 7 :

化合物 (I) は上記で示した製造法の他に、例えば WO92/01675、WO97/09315、WO99/65897、特開 2001-89452 等に記載の方法でまたはそれらに準じて得ることができる。また、例えば WO92/01675、WO97/09315、WO99/65897、特開 2001-89452、イー・キリングスバーグ (E. Klingsberg) 編、ザ・ケミストリー・オブ・ヘテロサイクリック・コンパウンズ (The Chemistry of Heterocyclic Compounds)、vol.14、ピリジン・アンド・イッツ・デリバティブス (Pyridine and Its Derivatives)、パート 1、ニューヨーク、インターサイエンス

(Interscience) (1960 年)、同パート 2 (1961 年)、同パート 3 (1962 年)、同パート 4 (1964 年)、ジー・アール・ニューコム (G. R. Newkome) 編、ザ・ケミストリー・オブ・ヘテロサイクリック・コンパウンズ (The Chemistry of Heterocyclic Compounds)、vol.14、ピリジン・アンド・イッツ・デリバティブス (Pyridine and Its Derivatives)、パート 5 (1984 年) 等に記載の方法でまたはそれらに準じて得られる化合物を中間体として、例えばシンレット (Synlett)、2000 年、p.625-626、ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティ (Journal of Chemical Society)、1952 年、p.800-803、テトラヘドロン (Tetrahedron)、1987 年、第 43 巻、p.2557-2564、ジャーナル・オブ・ヘテロサイクリック・ケミストリー (Journal of Heterocyclic Chemistry)、1987 年、第 24 巻、p.85-89、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (Journal of Organic Chemistry)、1995 年、第 60 巻、p.1875-1877 等に記載の方法でまたはそれらに準じて官能基変換を行うことにより、目的とする化合物を得ることができる。

化合物 (I)、原料化合物および中間体における各官能基の変換および置換基に含まれる官能基の変換は、公知の方法 [例えば、コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ第二版 (Comprehensive Organic Transformations, the second edition)、ラロック (R. C. Larock) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレーティッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999 年) に記載の方法] 等によって行うことができる。

上記の方法等を適宜組み合わせて実施することにより、所望の位置に所望の官能基を有する化合物 (I) を得ることができる。

上記製造法における中間体および目的化合物の単離・精製は、通常の有機合成で用いられる方法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、結晶化、各種クロマ

トグラフィー等を適宜組み合わせで行うことができる。さらに一般的な並列合成法で常用される精製法、例えば、スカベンジャーレジン、イオン交換レジン等を用いた精製法によって行うことができる。また、中間体においては、特に精製することなく次の反応に供することもできる。

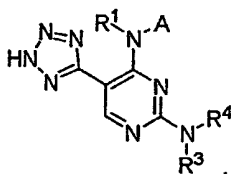
化合物(I) および化合物 (IA) には、位置異性体、幾何異性体、光学異性体または互変異性体のような異性体が存在し得るものもあるが、これらを含め可能な全ての異性体および該異性体のいかなる比率における混合物も本発明の治療剤に用いられるか、本発明に包含される。

化合物(I) または化合物 (IA) の塩を取得したい場合には、化合物(I) または化合物 (IA) の塩が得られるときはそのまま精製すればよく、化合物(I) または化合物 (IA) が遊離の形で得られるときは化合物(I) または化合物 (IA) を適当な溶媒に溶解または懸濁し、酸または塩基を加えて単離・精製すればよい。

また、化合物(I) 、化合物 (IA) またはそれらの薬理学的に許容される塩は、水または各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の治療剤に用いられるか、本発明に包含される。

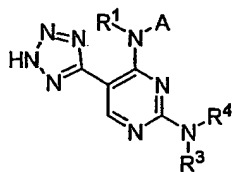
以下、本発明によって得られる化合物 (I) の具体例を第1表～第6表に示す。

第1表



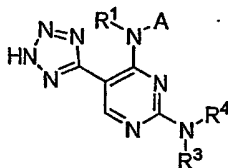
化合物 番号	-NR¹A	-NR³R⁴	機器データ
1			MS m/z 441 (M+H)⁺
2			MS m/z 441 (M+H)⁺
3			MS m/z 441 (M+H)⁺
4			MS m/z 441 (M+H)⁺
5			MS m/z 449 (M+H)⁺
6			MS m/z 449 (M+H)⁺
7			MS m/z 449 (M+H)⁺
8			MS m/z 457 (M+H)⁺
9			MS m/z 463 (M+H)⁺
10			MS m/z 465 (M+H)⁺
11			MS m/z 467 (M+H)⁺
12			MS m/z 471 (M+H)⁺

第2表



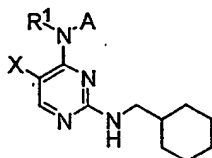
化合物 番号	←NR ¹ A	←NR ³ R ⁴	機器データ
13			MS m/z 443 (M+H) ⁺
14			MS m/z 443 (M+H) ⁺
15			MS m/z 443 (M+H) ⁺
16			MS m/z 443 (M+H) ⁺
17			MS m/z 451 (M+H) ⁺
18			MS m/z 451 (M+H) ⁺
19			MS m/z 451 (M+H) ⁺
20			MS m/z 459 (M+H) ⁺
21			MS m/z 465 (M+H) ⁺
22			MS m/z 467 (M+H) ⁺
23			MS m/z 469 (M+H) ⁺
24			MS m/z 473 (M+H) ⁺

第3表



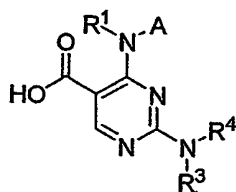
化合物 番号	-NR ¹ A	-NR ³ R ⁴	機器データ
25			MS m/z 422 (M+H) ⁺
26			MS m/z 427 (M+H) ⁺
27			MS m/z 433 (M+H) ⁺
28			MS m/z 441 (M+H) ⁺
29			MS m/z 457 (M+H) ⁺
30			MS m/z 457 (M+H) ⁺
31			MS m/z 446 (M+H) ⁺
32			MS m/z 451 (M+H) ⁺
33			MS m/z 457 (M+H) ⁺
34			MS m/z 465 (M+H) ⁺
35			MS m/z 481 (M+H) ⁺
36			MS m/z 481 (M+H) ⁺

第4表



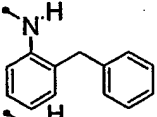
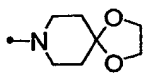
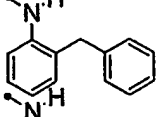
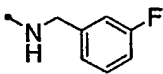
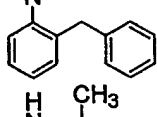
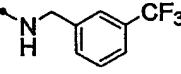
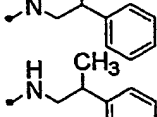
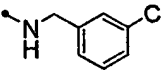
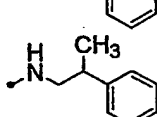
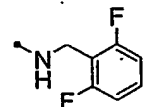
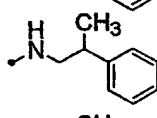
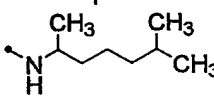
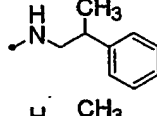
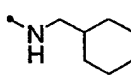
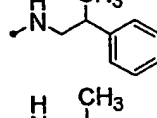
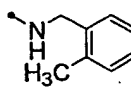
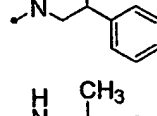
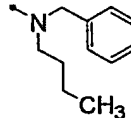
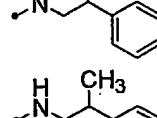
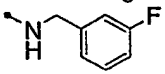
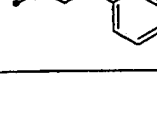
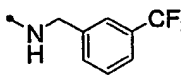

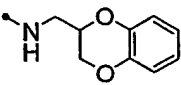
化合物 番号	-NR ¹ A	-X	機器データ
37			MS m/z 417 (M+H) ⁺
38			MS m/z 431 (M+H) ⁺
39			MS m/z 432 (M+H) ⁺
40			MS m/z 416 (M+H) ⁺
41			MS m/z 460 (M+H) ⁺
42			MS m/z 474 (M+H) ⁺
43			MS m/z 488 (M+H) ⁺
44			MS m/z 403 (M+H) ⁺
45			MS m/z 417 (M+H) ⁺
46			MS m/z 431 (M+H) ⁺
47			MS m/z 568 (M-H) ⁻
48			MS m/z 492 (M-H) ⁻
49			MS m/z 548 (M+H) ⁺

第5表



化合物 番号	-NR¹A	-NR³R⁴	機器データ
50			MS m/z 433 (M+H) ⁺
51			MS m/z 445 (M+H) ⁺
52			MS m/z 369 (M+H) ⁺
53			MS m/z 419 (M+H) ⁺
54			MS m/z 395 (M+H) ⁺
55			MS m/z 445 (M+H) ⁺
56			MS m/z 441 (M+H) ⁺
57			MS m/z 447 (M+H) ⁺
58			MS m/z 433 (M+H) ⁺
59			MS m/z 425 (M+H) ⁺
60			MS m/z 467 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
61			MS m/z 447 (M+H) ⁺
62			MS m/z 429 (M+H) ⁺
63			MS m/z 479 (M+H) ⁺
64			MS m/z 397 (M+H) ⁺
65			MS m/z 399 (M+H) ⁺
66			MS m/z 385 (M+H) ⁺
67			MS m/z 369 (M+H) ⁺
68			MS m/z 377 (M+H) ⁺
69			MS m/z 419 (M+H) ⁺
70			MS m/z 381 (M+H) ⁺
71			MS m/z 431 (M+H) ⁺
72			MS m/z 421 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
73			MS m/z 401 (M+H) ⁺
74			MS m/z 409 (M+H) ⁺
75			MS m/z 415 (M+H) ⁺
76			MS m/z 401 (M+H) ⁺
77			MS m/z 380 (M+H) ⁺
78			MS m/z 385 (M+H) ⁺
79			MS m/z 400 (M+H) ⁺
80			MS m/z 380 (M+H) ⁺
81			MS m/z 385 (M+H) ⁺
82			MS m/z 393 (M+H) ⁺
83			MS m/z 435 (M+H) ⁺
84			MS m/z 386 (M+H) ⁺

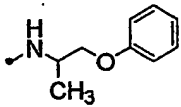
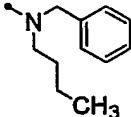
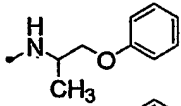
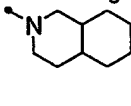
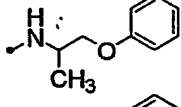
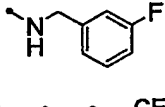
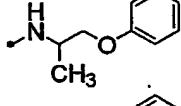
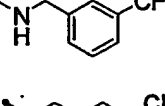
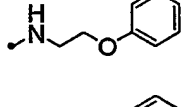
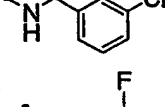
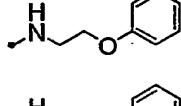
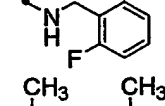
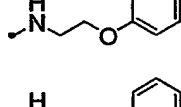
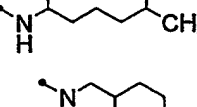
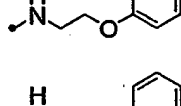
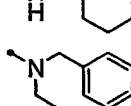
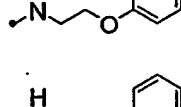
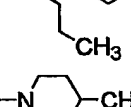
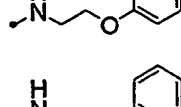
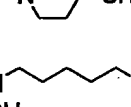
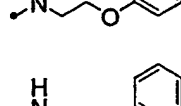
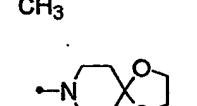
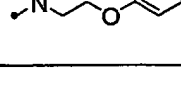
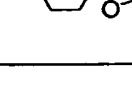
第5表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
85			MS m/z 401 (M+H) ⁺
86			MS m/z 387 (M+H) ⁺
87			MS m/z 401 (M+H) ⁺
88			MS m/z 356 (M+H) ⁺
89			MS m/z 347 (M+H) ⁺
90			MS m/z 386 (M+H) ⁺
91			MS m/z 469 (M+H) ⁺
92			MS m/z 402 (M+H) ⁺
93			MS m/z 415 (M+H) ⁺
94			MS m/z 444 (M+H) ⁺
95			MS m/z 411 (M+H) ⁺
96			MS m/z 397 (M+H) ⁺

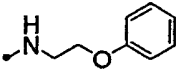
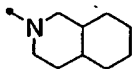
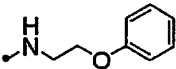
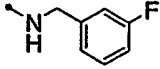
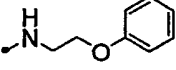
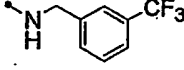
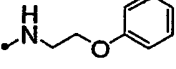
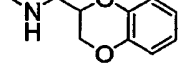
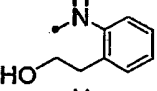
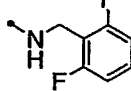
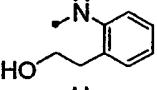
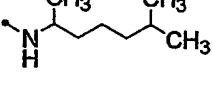
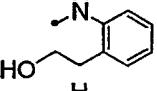
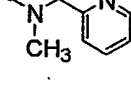
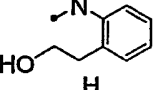
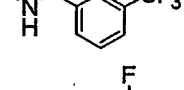
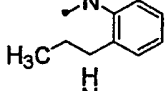
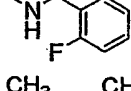
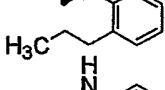
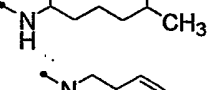
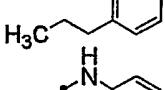
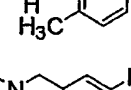
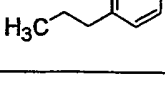
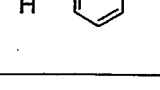
第5表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
97			MS m/z 407 (M+H) ⁺
98			MS m/z 423 (M+H) ⁺
99			MS m/z 427 (M+H) ⁺
100			MS m/z 392 (M-H) ⁻
101			MS m/z 447 (M+H) ⁺
102			MS m/z 437 (M+H) ⁺
103			MS m/z 409 (M+H) ⁺
104			MS m/z 415 (M+H) ⁺
105			MS m/z 401 (M+H) ⁺
106			MS m/z 385 (M+H) ⁺
107			MS m/z 385 (M+H) ⁺
108			MS m/z 393 (M+H) ⁺

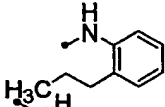
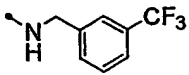
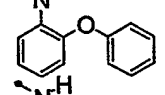
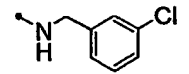
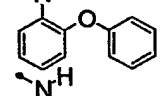
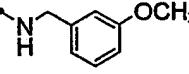
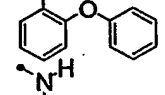
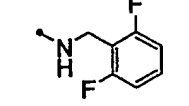
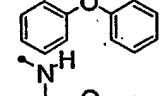
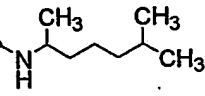
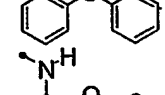
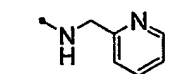
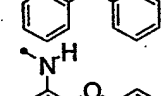
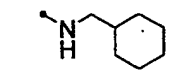
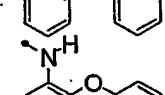
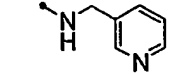
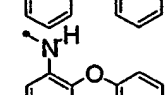
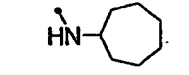
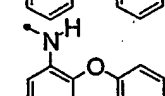
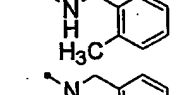
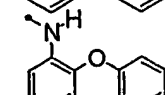
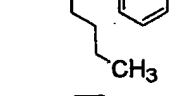
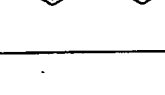
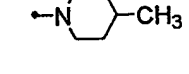
第5表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
109			MS m/z 435 (M+H) ⁺
110			MS m/z 411 (M+H) ⁺
111			MS m/z 397 (M+H) ⁺
112			MS m/z 447 (M+H) ⁺
113			MS m/z 399 (M+H) ⁺
114			MS m/z 401 (M+H) ⁺
115			MS m/z 387 (M+H) ⁺
116			MS m/z 371 (M+H) ⁺
117			MS m/z 421 (M+H) ⁺
118			MS m/z 357 (M+H) ⁺
119			MS m/z 373 (M+H) ⁺
120			MS m/z 401 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
121			MS m/z 397 (M+H) ⁺
122			MS m/z 383 (M+H) ⁺
123			MS m/z 433 (M+H) ⁺
124			MS m/z 423 (M+H) ⁺
125			MS m/z 401 (M+H) ⁺
126			MS m/z 387 (M+H) ⁺
127			MS m/z 380 (M+H) ⁺
128			MS m/z 433 (M+H) ⁺
129			MS m/z 399 (M+H) ⁺
130			MS m/z 385 (M+H) ⁺
131			MS m/z 377 (M+H) ⁺
132			MS m/z 381 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
133			MS m/z 431 (M+H) ⁺
134			MS m/z 447 (M+H) ⁺
135			MS m/z 443 (M+H) ⁺
136			MS m/z 449 (M+H) ⁺
137			MS m/z 435 (M+H) ⁺
138			MS m/z 414 (M+H) ⁺
139			MS m/z 419 (M+H) ⁺
140			MS m/z 414 (M+H) ⁺
141			MS m/z 419 (M+H) ⁺
142			MS m/z 427 (M+H) ⁺
143			MS m/z 469 (M+H) ⁺
144			MS m/z 405 (M+H) ⁺

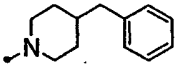
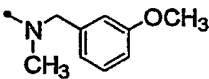
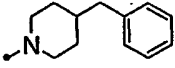
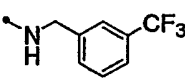
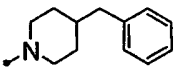
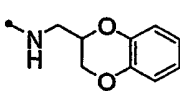
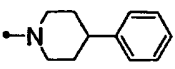
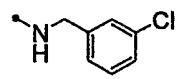
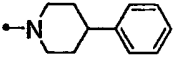
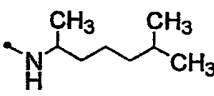
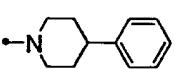
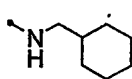
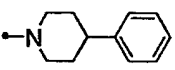
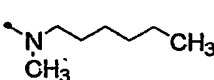
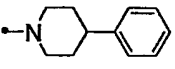
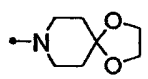
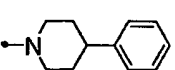
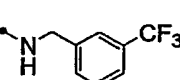
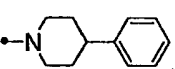
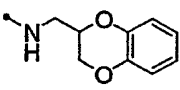
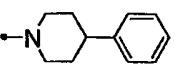
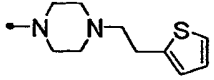
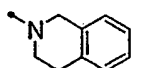
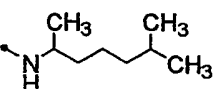
第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
145			MS m/z 449 (M+H) ⁺
146			MS m/z 431 (M+H) ⁺
147			MS m/z 427 (M+H) ⁺
148			MS m/z 481 (M+H) ⁺
149			MS m/z 471 (M+H) ⁺
150			MS m/z 425 (M+H) ⁺
151			MS m/z 413 (M+H) ⁺
152			MS m/z 397 (M+H) ⁺
153			MS m/z 397 (M+H) ⁺
154			MS m/z 435 (M+H) ⁺
155			MS m/z 397 (M+H) ⁺
156			MS m/z 420 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
157			MS m/z 409 (M+H) ⁺
158			MS m/z 459 (M+H) ⁺
159			MS m/z 435 (M+H-CO ₂) ⁺
160			MS m/z 449 (M+H) ⁺
161			MS m/z 480 (M+H) ⁺
162			MS m/z 437 (M+H) ⁺
163			MS m/z 433 (M+H) ⁺
164			MS m/z 425 (M+H) ⁺
165			MS m/z 409 (M+H) ⁺
166			MS m/z 367 (M+H-CO ₂) ⁺
167			MS m/z 395 (M+H-CO ₂) ⁺
168			MS m/z 421 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
169			MS m/z 403 (M+H-CO ₂) ⁺
170			MS m/z 471 (M+H) ⁺
171			MS m/z 461 (M+H) ⁺
172			MS m/z 423 (M+H) ⁺
173			MS m/z 411 (M+H) ⁺
174			MS m/z 395 (M+H) ⁺
175			MS m/z 353 (M+H-CO ₂) ⁺
176			MS m/z 425 (M+H) ⁺
177			MS m/z 457 (M+H) ⁺
178			MS m/z 447 (M+H) ⁺
179			MS m/z 434 (M+H-CO ₂) ⁺
180			MS m/z 383 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
181			MS m/z 412 (M+H) ⁺
182			MS m/z 396 (M+H) ⁺
183			MS m/z 398 (M+H) ⁺
184			MS m/z 458 (M+H) ⁺
185			MS m/z 461 (M+H) ⁺
186			MS m/z 446 (M+H) ⁺
187			MS m/z 426 (M+H) ⁺
188			MS m/z 431 (M+H) ⁺
189			MS m/z 486 (M+H) ⁺
190			MS m/z 399 (M+H) ⁺
191			MS m/z 383 (M+H) ⁺
192			MS m/z 391 (M+H) ⁺

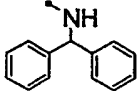
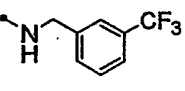
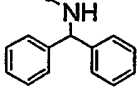
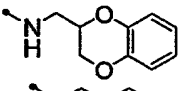
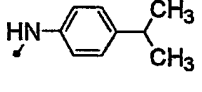
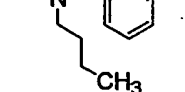
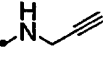
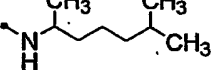
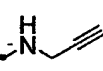
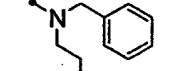
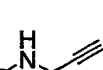
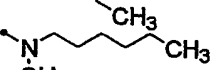
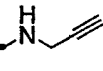
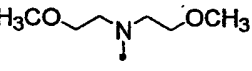
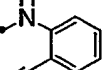
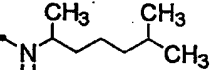
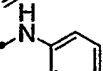
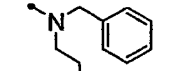
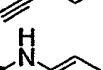
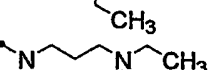
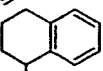
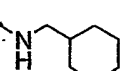
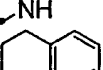
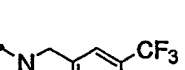
第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
193			MS m/z 433 (M+H) ⁺
194			MS m/z 385 (M+H) ⁺
195			MS m/z 409 (M+H) ⁺
196			MS m/z 395 (M+H) ⁺
197			MS m/z 445 (M+H) ⁺
198			MS m/z 433 (M+H) ⁺
199			MS m/z 417 (M+H) ⁺
200			MS m/z 425 (M+H) ⁺
201			MS m/z 467 (M+H) ⁺
202			MS m/z 403 (M+H) ⁺
203			MS m/z 433 (M+H) ⁺
204			MS m/z 419 (M+H) ⁺

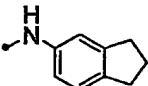
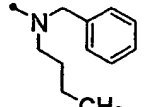
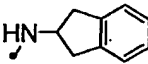
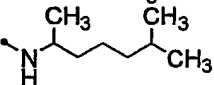
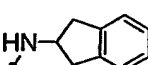
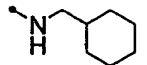
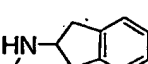
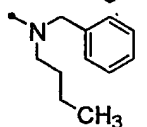
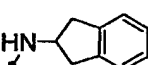
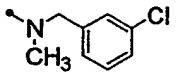
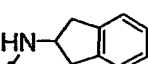
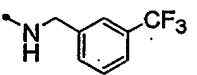
第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
205			MS m/z 433 (M+H) ⁺
206			MS m/z 447 (M+H) ⁺
207			MS m/z 443 (M+H) ⁺
208			MS m/z 455 (M+H) ⁺
209			MS m/z 479 (M+H) ⁺
210			MS m/z 445 (M+H) ⁺
211			MS m/z 433 (M+H) ⁺
212			MS m/z 417 (M+H) ⁺
213			MS m/z 467 (M+H) ⁺
214			MS m/z 455 (M+H) ⁺
215			MS m/z 455 (M+H) ⁺
216			MS m/z 443 (M+H) ⁺

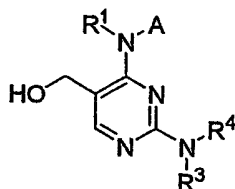
第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
217			MS m/z 479 (M+H) ⁺
218			MS m/z 469 (M+H) ⁺
219			MS m/z 419 (M+H) ⁺
220			MS m/z 305 (M+H) ⁺
221			MS m/z 339 (M+H) ⁺
222			MS m/z 291 (M+H) ⁺
223			MS m/z 309 (M+H) ⁺
224			MS m/z 367 (M+H) ⁺
225			MS m/z 401 (M+H) ⁺
226			MS m/z 368 (M+H) ⁺
227			MS m/z 381 (M+H) ⁺
228			MS m/z 443 (M+H) ⁺

第5表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
229			MS m/z 417 (M+H) ⁺
230			MS m/z 383 (M+H) ⁺
231			MS m/z 367 (M+H) ⁺
232			MS m/z 417 (M+H) ⁺
233			MS m/z 409 (M+H) ⁺
234			MS m/z 429 (M+H) ⁺

第6表

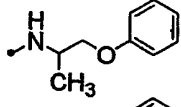
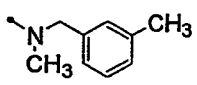
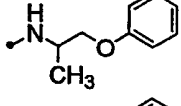
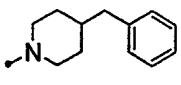
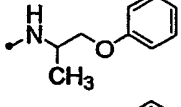
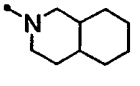
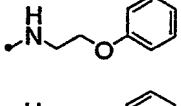
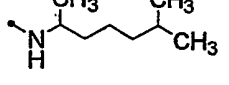
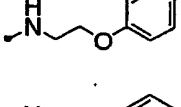
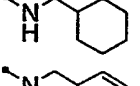
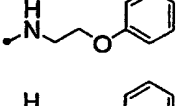
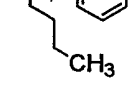
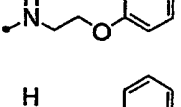
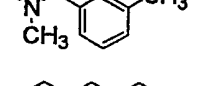
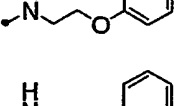
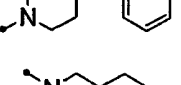
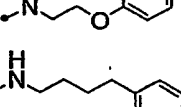
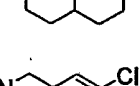
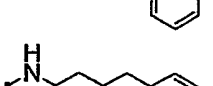
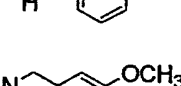

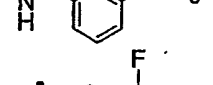
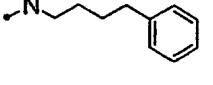
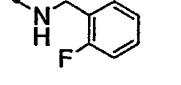


化合物 番号	-NR ¹ A	-NR ³ R ⁴	機器データ
235			MS m/z 393 (M+H) ⁺
236			MS m/z 419 (M+H) ⁺
237			MS m/z 381 (M+H) ⁺
238			MS m/z 411 (M+H) ⁺
239			MS m/z 431 (M+H) ⁺
240			MS m/z 379 (M+H) ⁺
241			MS m/z 371 (M+H) ⁺
242			MS m/z 355 (M+H) ⁺
243			MS m/z 405 (M+H) ⁺
244			MS m/z 367 (M+H) ⁺
245			MS m/z 377 (M+H) ⁺
246			MS m/z 397 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
247			MS m/z 417 (M+H) ⁺
248			MS m/z 381 (M+H) ⁺
249			MS m/z 385 (M+H) ⁺
250			MS m/z 371 (M+H) ⁺
251			MS m/z 355 (M+H) ⁺
252			MS m/z 363 (M+H) ⁺
253			MS m/z 367 (M+H) ⁺
254			MS m/z 417 (M+H) ⁺
255			MS m/z 387 (M+H) ⁺
256			MS m/z 371 (M+H) ⁺
257			MS m/z 421 (M+H) ⁺
258			MS m/z 383 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
259			MS m/z 393 (M+H) ⁺
260			MS m/z 433 (M+H) ⁺
261			MS m/z 397 (M+H) ⁺
262			MS m/z 373 (M+H) ⁺
263			MS m/z 357 (M+H) ⁺
264			MS m/z 407 (M+H) ⁺
265			MS m/z 379 (M+H) ⁺
266			MS m/z 419 (M+H) ⁺
267			MS m/z 383 (M+H) ⁺
268			MS m/z 397 (M+H) ⁺
269			MS m/z 393 (M+H) ⁺
270			MS m/z 399 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
271			MS m/z 385 (M+H) ⁺
272			MS m/z 369 (M+H) ⁺
273			MS m/z 377 (M+H) ⁺
274			MS m/z 419 (M+H) ⁺
275			MS m/z 381 (M+H) ⁺
276			MS m/z 391 (M+H) ⁺
277			MS m/z 411 (M+H) ⁺
278			MS m/z 431 (M+H) ⁺
279			MS m/z 431 (M+H) ⁺
280			MS m/z 385 (M+H) ⁺
281			MS m/z 399 (M+H) ⁺
282			MS m/z 451 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	-NR ¹ A	-NR ³ R ⁴	機器データ
283			MS m/z 407 (M+H) ⁺
284			MS m/z 381 (M+H) ⁺
285			MS m/z 377 (M+H) ⁺
286			MS m/z 403 (M+H) ⁺
287			MS m/z 365 (M+H) ⁺
288			MS m/z 375 (M+H) ⁺
289			MS m/z 395 (M+H) ⁺
290			MS m/z 415 (M+H) ⁺
291			MS m/z 427 (M+H) ⁺
292			MS m/z 433 (M+H) ⁺
293			MS m/z 403 (M+H) ⁺
294			MS m/z 415 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	-NR ¹ A	-NR ³ R ⁴	機器データ
295			MS m/z 399 (M+H) ⁺
296			MS m/z 395 (M+H) ⁺
297			MS m/z 387 (M+H) ⁺
298			MS m/z 371 (M+H) ⁺
299			MS m/z 433 (M+H) ⁺
300			MS m/z 371 (M+H) ⁺
301			MS m/z 433 (M+H) ⁺
302			MS m/z 387 (M+H) ⁺
303			MS m/z 401 (M+H) ⁺
304			MS m/z 397 (M+H) ⁺
305			MS m/z 453 (M+H) ⁺
306			MS m/z 366 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
307			MS m/z 400 (M+H) ⁺
308			MS m/z 409 (M+H) ⁺
309			MS m/z 333 (M+H) ⁺
310			MS m/z 391 (M+H) ⁺
311			MS m/z 366 (M+H) ⁺
312			MS m/z 357 (M+H) ⁺
313			MS m/z 357 (M+H) ⁺
314			MS m/z 352 (M+H) ⁺
315			MS m/z 352 (M+H) ⁺
316			MS m/z 355 (M+H) ⁺
317			MS m/z 429 (M+H) ⁺
318			MS m/z 435 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
319			MS m/z 421 (M+H) ⁺
320			MS m/z 405 (M+H) ⁺
321			MS m/z 413 (M+H) ⁺
322			MS m/z 417 (M+H) ⁺
323			MS m/z 435 (M+H) ⁺
324			MS m/z 433 (M+H) ⁺
325			MS m/z 429 (M+H) ⁺
326			MS m/z 417 (M+H) ⁺
327			MS m/z 427 (M+H) ⁺
328			MS m/z 467 (M+H) ⁺
329			MS m/z 400 (M+H) ⁺
330			MS m/z 400 (M+H) ⁺


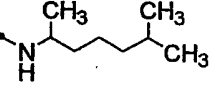
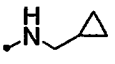
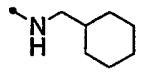
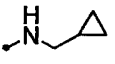
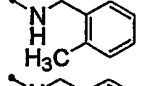
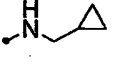
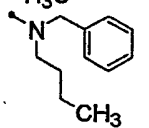

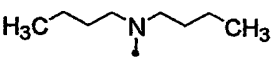
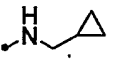
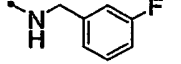
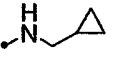
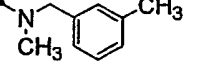
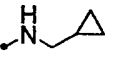
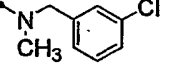
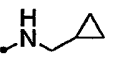
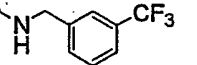
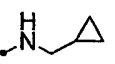
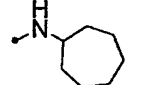
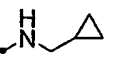
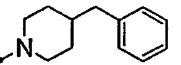
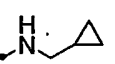
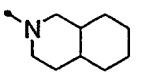
第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
331			MS m/z 398 (M+H) ⁺
332			MS m/z 445 (M+H) ⁺
333			MS m/z 441 (M+H) ⁺
334			MS m/z 425 (M+H) ⁺
335			MS m/z 439 (M+H) ⁺
336			MS m/z 459 (M+H) ⁺
337			MS m/z 479 (M+H) ⁺
338			MS m/z 401 (M+H) ⁺
339			MS m/z 385 (M+H) ⁺
340			MS m/z 435 (M+H) ⁺
341			MS m/z 397 (M+H) ⁺
342			MS m/z 411 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
343			MS m/z 380 (M+H) ⁺
344			MS m/z 399 (M+H) ⁺
345			MS m/z 387 (M+H) ⁺
346			MS m/z 379 (M+H) ⁺
347			MS m/z 421 (M+H) ⁺
348			MS m/z 383 (M+H) ⁺
349			MS m/z 387 (M+H) ⁺
350			MS m/z 371 (M+H) ⁺
351			MS m/z 379 (M+H) ⁺
352			MS m/z 421 (M+H) ⁺
353			MS m/z 383 (M+H) ⁺
354			MS m/z 369 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
355			MS m/z 307 (M+H) ⁺
356			MS m/z 291 (M+H) ⁺
357			MS m/z 299 (M+H) ⁺
358			MS m/z 341 (M+H) ⁺
359			MS m/z 307 (M+H) ⁺
360			MS m/z 303 (M+H) ⁺
361			MS m/z 313 (M+H) ⁺
362			MS m/z 333 (M+H) ⁺
363			MS m/z 353 (M+H) ⁺
364			MS m/z 291 (M+H) ⁺
365			MS m/z 353 (M+H) ⁺
366			MS m/z 317 (M+H) ⁺

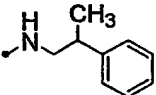
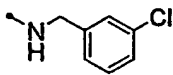
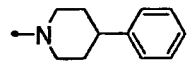
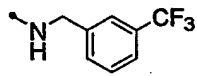
第6表 (続き)

化合物 番号	$\text{—NR}^1\text{A}$	$\text{—NR}^3\text{R}^4$	機器データ
367			MS m/z 286 (M+H) ⁺
368			MS m/z 385 (M+H) ⁺
369			MS m/z 357 (M+H) ⁺
370			MS m/z 352 (M+H) ⁺
371			MS m/z 411 (M+H) ⁺
372			MS m/z 398 (M+H) ⁺
373			MS m/z 416 (M+H) ⁺
374			MS m/z 413 (M+H) ⁺
375			MS m/z 389 (M+H) ⁺
376			MS m/z 397 (M+H) ⁺
377			MS m/z 401 (M+H) ⁺
378			MS m/z 409 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
379			MS m/z 384 (M+H) ⁺
380			MS m/z 433 (M+H) ⁺
381			MS m/z 405 (M+H) ⁺
382			MS m/z 467 (M+H) ⁺
383			MS m/z 423 (M+H) ⁺
384			MS m/z 415 (M+H) ⁺
385			MS m/z 368 (M+H) ⁺
386			MS m/z 419 (M+H) ⁺
387			MS m/z 467 (M+H) ⁺
388			MS m/z 400 (M+H) ⁺
389			MS m/z 455 (M+H) ⁺
390			MS m/z 433 (M+H) ⁺
391			MS m/z 417 (M+H) ⁺

第6表 (続き)

化合物 番号	—NR ¹ A	—NR ³ R ⁴	機器データ
392			MS m/z 383 (M+H) ⁺
393			MS m/z 443 (M+H) ⁺

次に、代表的な化合物 (I) の薬理作用について試験例により具体的に説明する。

試験例 1 : GPR88の機能抑制作用 (GPR88特異的な構成活性阻害作用)

参考例 5 で構築したGPR88アッセイ細胞 1 を白色プレートに1ウェル当たり 10⁵個ずつ播種し、GPR88を誘導発現するため、反応液中10 nmol/Lになるように 17β-エストラジオール (17β-estradiol、以下E2と略する; Sigma-Aldrich社製) を培地で希釈したものと試験化合物とを加え、5%CO₂インキュベーター中、37℃で6 時間反応させた。その後、Steady Glo Luciferase Assay System (Promega社製) 溶液を加え反応を停止し、トップカウント (Packard社製) で1秒間の発光量を測定した。

試験化合物の活性 (拮抗作用) は、下の式に示す通りE2添加時と非添加時の1秒あたりのカウント数をもとに算出した阻害率で表した。

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - \{(A - B) / (C - B)\}] \times 100$$

式中、A、B、Cは各々以下の意味を表す。

A : E2および試験化合物添加時の1秒あたりのカウント数

B : E2および試験化合物ともに非添加時の1秒あたりのカウント数

C : E2のみ添加時の1秒あたりのカウント数

IC₅₀値は、阻害率からLogit-Log変換法の線形近似解析法によって算出した。その結果を第7表に示す。

第7表

化合物番号	IC ₅₀ (nmol/L)
1	51
37	18
39	120
42	114
43	34

また、細胞を試験化合物の最終濃度が 3 μmol/Lになる条件で処理したときの阻害率 (%) を第8表に示す。

第8表

化合物番号	阻害率 (%) (3 μ mol/L)
44	96
47	86 (1 μ mol/L)
48	100
49	96
55	93
62	96
64	86
71	84
77	82
79	81
80	82
83	95
94	81
106	94
112	76
116	90
117	84
119	85
121	81
123	83
135	91
136	97
138	82
139	97
142	97
143	87
148	96
149	82
151	88
167	81
173	87
177	84
180	80

第 8 表続き

182	84
196	90
198	89
201	100
230	89
239	84
247	84
250	85
256	96
261	84
263	93
264	92
267	91
269	89
274	82
276	82
277	86
278	76
287	82
295	89
299	91
302	89
303	85
306	94
307	85
308	87
309	89
310	95
320	87
326	99
330	84
364	83
391	94
393	>60

以上の結果より、化合物 (I) は GPR88 の機能抑制作用 (GPR88 拮抗作用) を有することが示された。

また、WO03/087366 に記載の方法に従って、他の構成活性型 GPCR (例えば、GPR3、GPR4、GPR6 または GPR12) を誘導発現するアッセイ細胞を用いて同様のアッセイを行った際には、化合物 (I) は阻害活性を示さなかった。このことから、化合物 (I) は GPR88 の構成活性を特異的に阻害することが示された。

なお、参考例6および7でそれぞれ構築したGPR88アッセイ細胞2および3も、GPR88アッセイ細胞1と同様に、GPR88特異的な構成活性阻害物質（GPR88の機能抑制作用を有する物質）の探索に用いることができる。

試験例2：GPR88遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与による運動機能改善（ドパミン受容体拮抗薬によるモデル動物での評価）

配列番号7に示す塩基配列を有するGPR88遺伝子に対するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチド（Strg-AS1：ジェンセット社に合成を依頼した）（10 μ g/20 μ L）を、生理食塩液（大塚製薬社製）に溶解し、この溶液を、後述のドパミン受容体拮抗薬SCH23390投与の3日前から、2段針を用いて、12時間ごとに6回、マウスの脳室内へ繰り返し投与した。別のマウスに同様の手法でクマジー液を脳室内投与し、脳を摘出し投与液が脳内に拡散していることを確認した。Strg-AS1（10 μ g/20 μ L）の最終脳室内投与の3時間後に、ドパミン受容体拮抗薬SCH23390（0.5 mg/kg；シグマ社製を生理食塩水で0.05mg/mLに希釈）を皮下注射して、運動不全状態を作製した。SCH23390の皮下投与の30分後に、1匹ずつ高さ4.5cm、幅1.0cmの垂直に立てたアクリル製の台にマウスの両後肢を掛け、1分間を上限に動物が動き出すまでの時間（不動時間）を測定した。この不動時間を指標として運動機能不全の程度を表わした。なお、Strg-AS1を投与せずSCH23390のみを皮下投与した群を、陰性対照群とした。

その結果、SCH23390のみを皮下投与した陰性対照群における不動時間の平均は58秒間であった。一方、Strg-AS1を脳室内投与した群における不動時間は34.4秒間と減少し、運動機能を改善する作用が認められた。

つまり、Strg-AS1の繰り返し投与により、ドパミン受容体拮抗薬により誘発される運動不全状態は改善されたことから、GPR88遺伝子がドパミン神経系の運動調節に関係していることが明らかとなり、GPR88遺伝子を標的とした薬物は、脳内ドパミン神経系の異常に基づく疾患（例えばパーキンソン病、不随意運動、錐体外路症、うつ病、精神分裂病等）の治療および/または予防に有効であることが示唆された。

なお、Strg-AS1はマウスGPR88 mRNAの翻訳開始点を含む、配列番号5に示す塩基配列の401～418番目の配列と相補的な配列からなるホスホロチオエート・オリゴDNAである。また、Strg-AS1の塩基配列は、マウスGPR88 mRNAだけでなく、ヒトGPR88 mRNAの翻訳開始点を含む、配列番号4に示す塩基配列の425～442番目の配列とも相補的な配列であるため、ヒトに投与した場合もGPR88遺伝子の発現を抑制し、下記および試験例2で示されるマウスに対する作用と同様の作用を示すと考えられる。

試験例3：GPR88遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与による、中枢機能改善（レセルピン処置動物での評価）

後述のレセルピン投与の3日前から、2段針を用いて、生理食塩液に溶解したStrg-AS1（10 μ g/20 μ L）を、12時間ごとに6回マウスの脳室内へ繰り返し投与した。別のマウスに同様の手法でクマジー液を脳室内投与し、脳を摘出し投与液が脳内に拡散していることを確認した。Strg-AS1（10 μ g/20 μ L）の最終脳室内投与の20時間前に、レセルピン（2.5 mg/kg；アポロン注；第一製薬を蒸留水で0.25 mg/mLに希釈）を皮下注射して、中枢機能不全状態を作製した。レセルピ

ン投与の24時間後に、試験例2と同様の方法により測定を1匹ずつ行なって、1分間を上限にマウスが動き出すまでの時間（不動時間）を測定した。この不動時間を指標として中枢機能不全の程度を表わした。なお、Strg-AS1を投与せずレセルピンのみを皮下投与した群を、陰性対照群とした。

その結果、レセルピンのみを皮下投与した陰性対照群における不動時間の平均は60秒間であった。一方、Strg-AS1を脳室内投与した群における不動時間は39.6秒間と減少し、中枢機能を改善する作用が認められた。

つまり、GPR88遺伝子に対するホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドであるStrg-AS1の繰り返し投与により、レセルピン投与により誘発される中枢機能不全状態は改善された。すなわち、GPR88遺伝子を標的とした薬物は、脳内カテコールアミン神経系の異常に基づく（カテコールアミン枯渇に基づく）疾患（例えばパーキンソン病、不随意運動、錐体外路症、うつ病、精神分裂病等）の治療および／または予防に有効であることが示唆された。

試験例4：ドパミン受容体拮抗薬SCH23390誘発カタレプシーに対する作用

5週齢の雄性ddYマウス（体重22～25 g、日本エスエルシー）を1群10匹用いて実験を行った。SCH23390（シグマ社製）を生理食塩液（大塚製薬社製）に溶解し、マウスに0.5 mg/kgで皮下注射した。試験化合物（化合物37）は蒸留水（大塚製薬社製）で懸濁して用いた。SCH23390を皮下注射する30分前に、化合物37を含む懸濁液または蒸留水のみ（対照）をそれぞれ経口投与した（マウス体重10 gあたり0.1 mL）。化合物37投与の1時間後に1匹ずつ高さ4.5 cm、幅1.0 cmの垂直に立てたアクリル製の台にマウスの両前肢のみ、両後肢のみを順次懸け、カタレプシーを測定した。第9表にカタレプシースコアの判定基準を示す。

第9表

スコア	カタレプシーの持続時間
0	前肢を懸けた場合、後肢を懸けた場合共に、台に懸けたままその姿勢の持続時間が5秒未満。
1	(1) 前肢を台に懸けたままその姿勢を5秒以上、10秒未満保ち、後肢は持続時間が5秒未満。または (2) 前肢を台に懸けたままその姿勢を5秒未満保ち、後肢は持続時間が5秒以上、10秒未満。
2	前肢を台に懸けたままその姿勢を10秒以上保ち、後肢は持続時間が5秒未満。
3	(1) 前肢、後肢共に台に懸けたままその姿勢の持続時間が5秒以上、10秒未満。または (2) 前肢を台に懸けたままその姿勢の持続時間が5秒未満かつ後肢の持続時間が10秒以上。
4	(1) 前肢を台に懸けたままその姿勢を10秒以上保ち、後肢は持続時間が5秒以上、10秒未満。または (2) 前肢を台に懸けたままその姿勢を5秒以上、10秒未満保ち、後肢は持続時間が10秒以上。
5	前肢、後肢共に台に懸けたままその姿勢の持続時間が10秒以上。

作用の強度は、1群10匹のカタレプシースコアの平均値として表した(満点5点)。その結果を図1に示す。

図1より、化合物37の投与によりドパミン受容体拮抗薬の投与により誘発されるカタレプシー症状の改善(運動機能の改善)が認められ、化合物(I)がドパミン神経系の異常に基づく疾患(例えばパーキンソン病、不随意運動、錐体外路症、うつ病、精神分裂病等)の治療および/または予防に有効であることが示唆された。

試験例5：レセルピン誘発カタレプシーに対する作用

レセルピンのような抗精神病薬の投与で誘発されるカタレプシーは、パーキンソン病やうつ病の症候モデルとされている[ジャーナル・オブ・ニューラル・トランスミッション (Journal of Neural Transmission)、8巻、39-71頁(1994年)]。

5週齢の雄性ddYマウス(体重22~25 g、日本エスエルシー)を1群10匹用いて実験を行った。予備飼育期間中は、室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ の動物室内で飼育し、餌、水は自由に摂取させた。レセルピン(5 mg/kg：アボプロン注：第一製薬社製を蒸留水で希釈)を皮下投与して18時間後よりカタレプシー惹起作用を観察し、カタレプシースコアが5(試験例4第4表判定基準)を示すマウスを選別して実験に供した。試験化合物(化合物37)は、注射用蒸留水(大塚製薬社製)で懸濁液として用い、化合物37を含む懸濁液または注射用蒸留水のみ(対照)をそれぞれ経口投与(マウス体重10 gあたり0.1 mL)し、化合物37の投与1時間後に1匹ずつ高さ4.5 cm、幅1.0 cmの台にマウス両前肢のみ、両後肢のみを順次懸

け、カタレプシーを測定した。

作用の強度は、1群10匹のカタレプシースコアの平均値として表した(満点5点)。その結果を図2に示す。

図2より、化合物37の投与によりレセルピン投与により誘発されるカタレプシーの改善(中枢機能の改善)が認められ、化合物(I)は、脳内カテコールアミン神経系の異常に基づく(カテコールアミン枯渇に基づく)疾患(例えばパーキンソン病、不随意運動、錐体外路症、うつ病、精神分裂病等)の治療および/または予防に有効であることが示唆された。

試験例6：自発運動量の増大作用

5週齢の雄性ddYマウス(体重22~25g、日本エスエルシー)を1群10匹用いて実験を行った。化合物263を投与する一時間前に、マウスを幅40cm、奥行き40cm、高さ40cmの亚克力製の箱に静置し環境に馴化させた。化合物263は0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC;大塚製薬社製)を含む蒸留水で懸濁して用いた。化合物263(2.5mg/mL)を含む懸濁液または溶媒のみをそれぞれ腹腔内投与した(マウス体重10gあたり0.1mL)。自発運動量測定装置(SCANET MV-10MT、東洋産業株式会社医薬機器事業部)を用いて、身づくろい行動、歩行行動および後ろ足立ち行動の3項目について、投与直後から4時間測定した。明期の運動は午前10時から、暗期の運動は午後7時から測定した。

その結果、明期においては、溶媒を投与した陰性対照群および化合物263を投与した群における身づくろい行動はそれぞれ11013カウントおよび17830カウント、歩行行動はそれぞれ6745カウントおよび13613カウント、後ろ足立ち行動はそれぞれ19カウントおよび52カウント、と化合物263投与群でいずれも増大していた。

化合物263投与によって自発運動量が増大したことから、GPR88の機能抑制剤は運動機能障害を伴う疾患、例えばパーキンソン病、不随意運動、錐体外路症候群、ハンチントン舞踏病、脳血管疾患、脊髄小脳変性症等の治療および/または予防に有効であることが示唆された。

一方、暗期においては、溶媒を投与した陰性対照群および化合物263を投与した群における身づくろい行動はそれぞれ201564カウントおよび108411カウント、歩行行動はそれぞれ98254カウントおよび86677カウント、後ろ足立ち行動はそれぞれ1439カウントおよび541カウント、と化合物263投与群でいずれも減少していた。

以上のように、夜行性動物であるマウスにおいて、化合物263の投与によって明期の運動量が増大し暗期の運動量が減少した。このことは、体内時計が外界の明暗環境の周期に合わせる光同調を、GPR88が修飾していることを示唆している。したがってGPR88の機能制御剤はリズム障害、例えば時差ぼけや季節性感情障害等の治療および/または予防に有効であることが示唆された。

化合物(I)またはその薬理学的に許容される塩は、そのまま単独で投与することも可能であるが、通常各種の医薬製剤として提供するのが望ましい。また、それら医薬製剤は、動物および人に使用されるものである。

本発明に係わる医薬製剤は、活性成分としてGPR88に対する抗体もしくは化合物(I)またはその薬理学的に許容される塩を単独で、あるいは任意の他の治療の

ための有効成分との混合物として含有することができる。また、それら医薬製剤は、活性成分を薬理学的に許容される一種もしくはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

投与経路としては、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与または静脈内等の非経口投与をあげることができる。

投与形態としては、錠剤、注射剤等が例示される。

錠剤の調製にあたっては、例えば乳糖、マンニット等の賦形剤、デンプン等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を常法に従って用いればよい。

注射剤の調製にあたっては、水、生理食塩水、植物油、可溶化剤、保存剤、抗酸化剤等を常法に従って用いればよい。

化合物 (I) またはその薬理学的に許容される塩の有効量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度等により異なるが、通常、例えば、成人一日当り0.1~100mg/kgを3~4回に分けて投与するのが好ましい。しかしながら、これら投与量および投与回数は前述の種々の条件等により変動する

図面の簡単な説明

第1図は、ドパミン受容体拮抗薬SCH23390誘発カタレプシーに対する化合物37の1ナトリウム塩の作用の強度をカタレプシースコアとして示したものである。縦軸はカタレプシースコア（満点5点）を表し、横軸は化合物37の1ナトリウム塩の投与量（mg/kg）を表す。棒グラフは左が対照群の場合を示し、他は化合物37の1ナトリウム塩の投与群の場合を示す。*は $p < 0.05$ (Steel test) の有意差を示し、**は $p < 0.01$ (Steel test) の有意差を示す。

第2図は、レセルピン誘発カタレプシーに対する化合物37の1ナトリウム塩の作用の強度をカタレプシースコアとして示したものである。縦軸はカタレプシースコア（満点5点）を表し、横軸は化合物37の1ナトリウム塩の投与量

(mg/kg)を表す。棒グラフは左が対照群の場合を示し、右は化合物37の1ナトリウム塩の投与群の場合を示す。*は $p < 0.05$ (Steel test) の有意差を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例および参考例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例により限定されることはない。

下記実施例および参考例中の各化合物の物理化学的データは、以下の機器類によって測定した。

^1H NMR : JEOL EX-270型(270MHz)またはJEOL GX-270型(270MHz)

IR : HORIBA FT-200

MS : Micromass Quattro (APCI法)またはMicroMass ZQ2000 (ESI法)

参考例1 Gal4-ERを発現する宿主細胞KJMGER8および誘導発現用ベクターpAGal9-dおよびpAGal9-ndの造成

(1) Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2の造成

pSV2bsr(科研製薬株式会社製)をPvuIIとEcoRIで切断後、Klenow処理して2.6kbのPvuII(平滑末端)－EcoRI(平滑末端)断片を取得した。

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の転写因子Gal4pのDNA結合領域とエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質 (Gal4-ER) の遺伝子 [Cell, 54, 199 (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1657 (1993)] を含有するER α AF2 in pM (東京大学の加藤茂明先生より分与) をAatIIとNdeIで切断後、Klenow処理して、AatII(平滑末端)－NdeI(平滑末端)断片を取得した。

上記のpSV2bsr由来のPvuII(平滑末端)－EcoRI(平滑末端)断片およびER α AF2 in pM由来のAatII(平滑末端)－NdeI(平滑末端)断片を結合することにより、Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2を造成した。

(2) ホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドの造成

pcDNA3(インビトロジェン社)をXhoIで切断後、Klenow処理して、XhoI(平滑末端)断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI切断部位を消失させたpcDNA3を造成した。XhoI切断部位を消失させたpcDNA3をKpnIで切断後、Klenow処理して、KpnI(平滑末端)断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoIおよびKpnI切断部位を消失させたpcDNA3を造成した。該プラスミドをBglIIで切断後、Klenow処理し、BglII(平滑末端)断片を取得した。

pAMoERC3Sc(特開平05-336963)をXhoIとNsiIで切断後、Klenow処理し、oriP配列を含む2.2kbのXhoI(平滑末端)－NsiI(平滑末端)断片を取得した。

上記のXhoI切断部位とKpnI切断部位を消失させたpcDNA3由来のBglII(平滑末端)断片およびpAMoERC3Sc由来のXhoI(平滑末端)－NsiI(平滑末端)断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriPを造成した。pcDNA3-oriPをXhoIとHindIIIで切断し、XhoI－HindIII断片を取得した。

pSE0luc2(WO98/14474)をXhoIとNcoIで切断後、Klenow処理して、アンピシリン耐性遺伝子を含むXhoI(平滑末端)－NcoI(平滑末端)断片を取得した。該断片を結合することにより、プラスミドpASd1-luc1を造成した。pASd1-luc1をXhoIとHindIIIで切断後、0.11kbのXhoI－HindIII断片を取得した。

上記のpcDNA3-oriP由来のXhoI－HindIII断片およびpASd1-luc1由来のXhoI－HindIII断片を結合し、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1を造成した。

pcDNA3-oriP-Sd1をXhoIとKpnIで切断し、XhoI－KpnI断片を取得した。

配列番号8、9、10および11で表される塩基配列を有する4種のDNAを合成した。該合成DNAは混合してアニールすることによりポリアデニル化シグナルをもつ2本鎖DNAを形成する。該合成DNAをそれぞれT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化後、混合してアニールさせることにより、二本鎖DNAとした。

該二本鎖DNAとpcDNA3-oriP-Sd1由来のXhoI－Asp718断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1-pAを造成した。pcDNA3-oriP-Sd1-pAをXhoIで切断後、Klenow処理して、XhoI(平滑末端)断片を取得した。

pFR-luc(ストラタジーン社製)をHindIIIとBamHIで切断、Klenow処理し、0.14kbのHindIII(平滑末端)－BamHI(平滑末端)断片を取得した。

上記のpcDNA3-oriP-Sd1-pA由来のXhoI(平滑末端)断片およびpFR-luc由来のHindIII(平滑末端)－BamHI(平滑末端)断片を結合し、プラスミドpAGalSd1を作製した。pAGalSd1は、Gal4p応答配列(UASG)を5回繰り返した配列を有

するプロモーターを含有している。pAGalSd1をEcoRIで切断後、Klenow処理し、EcoRI（平滑末端）断片を取得した。

pSE0luc2（WO98/14474）をHindIIIとSacIで切断後、Klenow処理することにより、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.7kbのHindIII（平滑末端）－SacI（平滑末端）断片を取得した。

上記のpSE0luc2由来のHindIII（平滑末端）－SacI（平滑末端）断片およびpAGalSd1由来のEcoRI（平滑末端）断片を結合することにより、プラスミドpAGalSd1-lucを造成した。

上記のpAGalSd1-luc内に存在する二つのHindIIIサイトのうち、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子から離れた位置に存在する1つのHindIIIサイトのみをKlenow処理により消失させることにより、pAGalSd4-lucを造成した。

上記のpAGalSd4-lucをAsp718で切断後、StuIで部分消化しpAGalSd4-luc由来の9.5kbのAsp718－StuI断片を取得した。該DNA断片をKlenow処理し、自己結合させることによりプラスミドpAGal9-lucを造成した。

（3）誘導発現ベクターpAGal9-dおよびpAGal9-ndの造成

上記（2）で造成したプラスミドpAGal9-lucをHindIIIとSacIで切断し、oriPを含む6.9kbのHindIII－SacI断片を取得した。

pAMo-d（特開2001-211885）をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子（Tc^R）を含むHindIII－SacI断片を取得した。

上記のpAGal9-luc由来のHindIII－SacI断片およびpAMo-d由来のHindIII－SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAMo-dのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-dを造成した。

pAMo-nd（特開2001-211885）をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子を含むHindIII－SacI断片を取得した。

上記のpAGal9-luc由来のHindIII－SacI断片、およびpAMo-nd由来のHindIII－SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAMo-ndのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-ndを造成した。

（4）Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2をNamalwa KJM-1細胞の染色体DNAに組み込んだ細胞株KJMGER8の造成

（1）で造成したpGERbsrR2を、1 μ g/ μ LになるようにTE緩衝液〔10 mmol/L Tris-HCl(PH8.0)、1 mmol/L エチレンジアミン4酢酸〕に溶解した後、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕により、該プラスミドをNamalwa KJM-1細胞〔Cytotechnology, 1, 151 (1988)〕に、1.6 \times 10⁶細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞を得た。Namalwa KJM-1細胞は、EBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である。

該形質転換体を、8mLのRPMI1640・ITPSG培地〔RPMI1640培地（日水製薬社製）に、1/40量の7.5% NaHCO₃、3% 200mmol/L L-グルタミン溶液（インビトロジェン社製）、0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液（インビトロジェン社製、5,000units/mL ペニシリン、5,000 μ g/mL ストレプトマイシン）、10mmol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸

(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; HEPES)、3 μ g/mL インシュリン、5 μ g/mL トランスフェリン、5 mmol/L ピルビン酸ナトリウム、125 nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1 mg/mL ガラクトースを添加した培地] に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。

培養後、プラストサイジンS (Blastcidin S) (KK-400: 科研製薬株式会社製) を2.0 μ g/mLになるように添加し、96穴プレートに分注

(500~2000細胞/穴) して培養を行い、pGERbsrR2が染色体DNAに組み込まれた安定形質転換株 (シングルクローン) を多数取得した。各形質転換株は、2.0 μ g/mLのプラストサイジンSを含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

下記に示す方法により上記安定形質転換株から、誘導倍率が高く、かつ非誘導時のバックグラウンドが低い優れた安定形質転換株KJMGER8細胞を選択した。

各形質転換株にホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドpAGalSd1-lucをエレクトロポレーション法により導入し、2日間培養した。

培養後、E2 (E8875: シグマ・アルドリッチ社製) (終濃度10nmol/L) を添加し、更に24時間培養後、ホタル・ルシフェラーゼ活性の測定を行った。活性の測定は、ルミノメーターLB953 (ベルトールド社製) を用い、細胞溶解用緩衝液 [1%トリトンX-100、100 mmol/L KH₂PO₄ (pH7.8)、1 mmol/Lジチオスレイトール] 100 μ Lを、上記培養液に自動注入後、基質溶液 [25 mmol/L グリシルグリシン (pH7.8)、15 mmol/L MgSO₄、5 mmol/L ATP、0.33 mmol/L ルシフェリン] 300 μ Lを自動注入し、10秒間の発光量を測定し、ルシフェラーゼ活性とした。比較のために、E2無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

E2添加条件下のルシフェラーゼ活性とE2無添加条件下のルシフェラーゼ活性を比較することにより、遺伝子発現の誘導倍率を算出し、該誘導倍率が高く、且つE2無添加条件下のルシフェラーゼ活性が低いクローンとして、KJMGER8細胞を選択した。

(5) KJMGER8を宿主としたホタル・ルシフェラーゼ遺伝子の誘導発現

(4) で選択したKJMGER8細胞に (2) で造成したホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドpAGal9-lucまたは (3) で造成したコントロールプラスミド (pAGal9-nd) を、エレクトロポレーション法により、 1.6×10^6 細胞あたり4 μ g導入し、安定形質転換株 (KJMGER8/pAGal9-lucおよびKJMGER8/pAGal9-nd) を取得した。

該安定形質転換株を、8mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。

培養後、プラストサイジンS (0.2 μ g/mL) およびジェネティシン

(Geneticin; インビトロジェン社製) (0.5mg/mL) を添加し、更に14日間培養し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、プラストサイジンS

(0.2 μ g/mL) およびジェネティシン (インビトロジェン社製) (0.5mg/mL) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

該形質転換株にE2(E8875: シグマ社製) (終濃度10nmol/L) を添加して24時間培養後、上記と同様にしてルシフェラーゼ活性の測定を行った。比較のために、E2無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

E2添加条件下のルシフェラーゼ活性とE2無添加条件下のルシフェラーゼ活性

を比較することにより、遺伝子発現の誘導倍率を算出した。その結果、KJMGER8/pAGal9-lucにおける遺伝子発現の誘導倍率は、約1万倍であった。E2無添加条件下でのKJMGER8/pAGal9-luc中のルシフェラーゼ活性は非常に低かった(約60RLU/10秒)。この結果は、E2無添加条件下ではほとんどルシフェラーゼ遺伝子が発現していないことを示している。

上記のように、pAGal9-lucを誘導発現プラスミド、KJMGER8を宿主として用いた系においては、非誘導時のルシフェラーゼ活性が非常に低く、誘導時のルシフェラーゼ活性が非常に高かった。pAGal9-lucの構造は、pAGal9-ndまたはpAGal9-dに誘導発現させるレポーター遺伝子として、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した構造である。したがって、KJMGER8を宿主、pAGal9-ndまたはpAGal-dを誘導発現ベクターとして用いる系は、非誘導時の遺伝子発現量が非常に低く、かつ遺伝子発現の誘導倍率が高い、極めて優れた誘導発現系であることが判明した。

参考例2 Gal4-ERを発現し、レポータープラスミドを導入した宿主細胞GBC7およびGBCR2の作製

(1) ホタル・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミドpACRElucおよびpACREplucの造成

cAMP応答配列(CRE)の制御下にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子が発現することのできるレポータープラスミドであるpACRElucおよびpACREplucを以下の方法で造成した。pACRElucおよびpACREplucは、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびエプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有している。

pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] をClaIで部分消化し、一カ所切断されたDNA断片を取得した。該DNA断片をMluIで部分消化し、9.5kbのClaI-MluI断片を取得した。pAGE248 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] をClaIおよびMluIで切断し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む1.5kbのClaI-MluI断片を取得した。pAMo由来のClaI-MluI断片、およびpAGE248由来のClaI-MluI断片を結合し、プラスミドpAMohを造成した。

造成したpAMohをXhoIとHindIIIで切断後、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むXhoI-HindIII断片を取得した。pAGal9-lucをSalIとHindIIIで切断し、oriP、UASGを含むSalI-HindIII断片を取得した。pAGal9-luc由来のSalI-HindIII断片、および上記のpAMoh由来のXhoI-HindIII断片を結合することにより、プラスミドpAGal9hを造成した。

pBluescript II KS+ (ストラタジーン社製) をSalIおよびXhoIで切断した後、アルカリフォスファターゼ (E. coli C75由来、宝酒造株式会社製) を用いて脱リン酸化処理し、アンピシリン耐性遺伝子を含むSalI-XhoI断片を取得した。配列番号12および13で表される塩基配列を有す合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより、CRE配列を2つ含む二本鎖DNAを調製した。該二本鎖DNAとpBluescript II KS+由来の上記SalI-XhoI断片を結合し、CRE配列を2つ含むプラスミドpBS-CREIを造成した。pBS-CREIは、該二本鎖DNAが、SalI切断部位およびXhoI切断部位が再生する方向に組み込まれたプラスミドであり、上記切断部位をそれぞれ1つ有している。

pBS-CREIをScaIおよびXhoIで切断しファージf1のoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIをScaIおよびSalIで切断しColE1 oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREI由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を4つ含むpBS-CREIIを造成した。

上記のpBS-CREIIをScaIおよびXhoIで切断しファージf1のoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIIをScaIおよびSalIで切断しColE1 oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREII由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を8つ含むpBS-CREIVを造成した。

上記のpBS-CREIVをScaIおよびXhoIで切断しファージf1のoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIVをScaIおよびSalIで切断しColE1 oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREIV由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を16含むpBS-CREVIIIを造成した。

上記のpBS-CREVIIIをXhoIで切断後、Klenow処理し、更にHindIIIで切断することにより、16個のCREを含むHindIII-XhoI (平滑末端)断片を取得した。pAGalSd1をMluIとHindIIIで切断し、1.4kbのMluI-HindIII断片を取得した。pAGal9hをXbaIで切断後、Klenow処理し、更にMluIで切断することによりXbaI (平滑末端) -MluI断片を取得した。pBS-CREVIII由来のHindIII-XhoI (平滑末端)断片、pAGalSd1由来のMluI-HindIII断片、およびpAGal9h由来のXbaI (平滑末端) -MluI断片を結合し、プラスミドpACREhを作製した。

参考例2の(2)で造成したpAGal9-lucをXhoIとNotIで切断し、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むXhoI-NotI断片を取得した。pACREhをXhoIとNotIで切断し、CRE配列を含むXhoI-NotI断片を取得した。pAGal9-luc由来のXhoI-NotI断片、およびpACREh由来のXhoI-NotI断片を結合することによりプラスミドpACRElucを作製した。

上記のpACRElucをHindIIIで切断後、Klenow処理し、更にXhoIで切断することによりCREを含むHindIII (平滑末端) -XhoI断片、およびホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むHindIII (平滑末端) -XhoI断片をそれぞれ取得した。pACREluc由来の上記2種のHindIII (平滑末端) -XhoI断片を結合することにより、pACREluc中のCRE配列上流のHindIIIサイトが消失したプラスミドpACRElucHを作製した。

pGL3-Enhancer vector [プロメガ(Promega)社製]をHindIIIとHpaIで切断し、luc+遺伝子(改変型のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子)を含むHindIII-HpaI断片を取得した。上記で作製したpACRElucHをNotIで切断後、Klenow処理し、更にHindIIIで切断することにより、CREを含むHindIII-NotI (平滑末端)断片を取得した。pGL3-Enhancer vector由来のHindIII-HpaI断片、およびpACRElucH由来のHindIII-NotI (平滑末端)断片を結合することによりレポータープラスミドpACREplucを作製した。

(2) レポータープラスミドpACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞の造成

上記(1)で作製したレポータープラスミドpACREplucを、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるようにTE緩衝液に溶解した後、該プラスミドを、エレクトロポレーション法によりNamalwa KJM-1細胞に、 1.6×10^6 細胞あたり $4\mu\text{g}$ 導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換細胞を8 mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベータ

一中、37℃で24時間培養した。培養後、ハイグロマイシンB (Hygromycin B) (300 μ g/mL) を添加し、更に14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

CREを介した遺伝子発現が起こるかどうかを確認するために、該形質転換株を、2a型のアデノシン受容体 (A2a) のアゴニストである5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン (NECA: シグマーアルドリッチ社製)、アデニレートシクラーゼの活性剤であるフォルスコリン (シグマーアルドリッチ社製)、またはカルシウムイオノフォアであるA23187 [リサーチ・バイオケミカル・インターナショナル (Research Biochemicals International) 社製] を用いて、下記条件で刺激した。

即ち、上記安定形質転換株を48穴プレート1穴あたり 1×10^5 細胞ずつ分注し、NECA (終濃度100nmol/L)、フォルスコリン (終濃度100 μ mol/L)、またはA23187 (終濃度10 μ mol/L) を添加後、CO₂インキュベーター中、37℃で5時間培養し、刺激した。

刺激後、参考例1の(4)に記載の方法を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性測定をおこなった。

その結果、NECA刺激で約7倍、フォルスコリン刺激で約10倍のホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇がみられた。一方、A23187刺激ではホタル・ルシフェラーゼ活性はほとんど変化しなかった。

以上の結果から、pACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞においては、CREからの転写を促す刺激により、ルシフェラーゼ遺伝子が発現することが明らかになった。

即ち、pACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞を用いることにより、CREからの転写を促す活性を有する物質を探索することが可能である。

pACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞をNECAで刺激し、6、24、48、72、および96時間後にホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した結果、6時間で活性が最大となり、24時間でほぼ半減した。従って、該細胞を任意の物質で刺激する場合は、刺激後6時間目に活性を測定することが好ましいと考えられた。

(3) レポータープラスミドpACREplucをKJMGER8の染色体DNAに組み込んだ安定形質転換株の造成

(1) で作製したpACREpluc中のoriP内に1個所存在する制限酵素であるHpaI、SpeI、またはBamHIで切断したpACREplucを1 μ g/ μ LになるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法により、参考例1の(4)で造成したKJMGER8に、 1.6×10^6 細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換細胞を8mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。培養後、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL) およびハイグロマイシンB (300 μ g/mL) を添加し、更に7日間培養した。生細胞数を確認後、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL) およびハイグロマイシンB

(300 μ g/mL) およびKJMGER8を 1×10^5 細胞/mLを含むRPMI1640・ITPSG培地で、150細胞/mLになるように希釈し、96穴プレートに分注 (平均30細胞/穴) して培養を行い、実際に1穴当たり1コロニーを形成した穴を選択し、420個の安定形質転換株 (シングルクローン) を取得した。各形質転換株は、プラストサイ

ジンS ($2.0 \mu\text{g/mL}$) およびハイグロマイシンB ($300 \mu\text{g/mL}$) を含む RPMI1640・ITPSG培地で継代した。

(4) 優れた性質を有する安定形質転換株 (シングルクローン) の選択

上記 (3) で取得した各クローンを96穴プレートにまき

($1 \sim 2 \times 10^4$ 細胞/穴)、NECA (終濃度 100nmol/L) を添加して CO_2 インキュベーター中、 37°C で6時間培養した。

培養後、参考例1の(4)に記載の方法を用いて各穴のホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。測定器としてはMicro Lumat LB96P (ベルトールド社製) を使用した。活性の高かった17クローンを選択した。

該17クローンをを用い、上記(2)と同様の方法でNECA刺激し、NECA刺激しない場合と比較し、ルシフェラーゼ活性が60倍以上上昇した8クローンを選択した。該8クローンをそれぞれGBC1、GBC2、GBC3、GBC4、GBC5、GBC6、GBC7 およびGBC8と命名した。

該8クローンにpAGal9-GPR12 [構成活性型のG蛋白質共役型受容体であるGPR12を誘導発現するためのプラスミド：下記参考例4の(3)参照] を、上記エレクトロポレーション法により、 1.6×10^6 細胞あたり $4 \mu\text{g}$ 導入し、形質転換株を取得した。

該形質転換株を8mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、 CO_2 インキュベーター中、 37°C で24時間培養した。

培養後、プラストサイジンS ($2.0 \mu\text{g/mL}$)、ハイグロマイシンB ($300 \mu\text{g/mL}$) およびジェネティシン ($500 \mu\text{g/mL}$) を添加し、更に14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、プラストサイジンS ($2.0 \mu\text{g/mL}$)、ハイグロマイシンB ($300 \mu\text{g/mL}$) およびジェネティシン ($500 \mu\text{g/mL}$) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

各形質転換株にE2 (終濃度 10nmol/L) を添加して24時間培養後、参考例1の(4)と同様の方法によりルシフェラーゼ活性を測定した。比較のために、E2無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

E2を添加した際のルシフェラーゼ活性の上昇率が高かった3クローン (GBC5、GBC6、GBC7) を選択した。GBC5、GBC6およびGBC7における該上昇率は、それぞれ56、193、および364倍であった。

該3クローンに、上記と同様の方法で2型バソプレッシン受容体 (V2) 誘導発現プラスミドpAGal9-V2 (下記参考例4の(1)参照) を導入して安定形質転換株を取得し、E2刺激により導入遺伝子 (V2遺伝子) を誘導発現させた後に、バソプレッシン刺激した際のルシフェラーゼ活性を調べた。同時に、E2刺激しない場合の活性、およびバソプレッシン刺激しない場合の活性を調べた。

以上の結果、E2で刺激した時にのみバソプレッシンに反応して高いルシフェラーゼ活性 (599倍) を示したGBC7を優良株として選択した。

(5) ウミシイタケ・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミド pACRERlucの造成

pRL-SV40 vector (プロメガ社製) をXbaIで切断し、Klenow処理後、更にHindIIIで切断し、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を含むHindIII-XbaI

(平滑末端) 断片を取得した。上記(1)で構築したpACRElucHをNotIで切断

後、Klenow処理し、更にHindIIIで切断することによりCREを含むHindIII-NotI（平滑末端）断片を取得した。pRL-SV40 vector由来のHindIII-XbaI（平滑末端）断片、およびpACRElucH由来のHindIII-NotI（平滑末端）断片を結合することによりプラスミドpACRERlucを造成した。

（6）レポータープラスミドpACRERlucをKJMGER8の染色体DNAに組み込んだ安定形質転換株の造成

上記（3）で記載した方法に準じて、pACRERlucをKJMGER8に導入し、96個の安定形質転換株（シングルクローン）を取得した。各形質転換株は、プラストサイジンS（ $2.0 \mu\text{g/mL}$ ）およびハイグロマイシンB（ $300 \mu\text{g/mL}$ ）を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

（7）優れた性質を有する安定形質転換株（シングルクローン）の選択

ホタル・ルシフェラーゼの活性を測定する代わりにウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性を測定する以外は、上記（4）に記載した方法に準じ、上記（6）で取得したクローンの中から優れた性質を有するクローンの選択を行った。

上記（6）で取得した各クローンを96穴プレートにまき

（ $1 \sim 2 \times 10^4$ 細胞/穴）、NECA（終濃度 100nmol/L ）を添加して CO_2 インキュベーター中、 37°C で6時間培養した。その後、セレンテラジンh（モレキュラー・プローブズ社）（終濃度 250nmol/L ）を添加してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。活性測定には、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタ（ワラック・ベルトールド・ジャパン社製）を用いた。活性の高かった9クローンを選択した。該9クローンをそれぞれGBCR1、GBCR2、GBCR3、GBCR4、GBCR5、GBCR6、GBCR7、GBCR8およびGBCR9と命名した。

該9クローンについて、NECA刺激し、NECA刺激しない時と比較し、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性が18倍以上上昇した2クローンを選択した。該2クローンをそれぞれGBCR1およびGBCR2と命名した。

該2クローンにpAGal9-GPR12を導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株をE2で24時間刺激後、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。比較のために、E2無添加条件下でのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性も測定した。E2を添加した際のウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の上昇率が高かった1クローン（GBCR2）を優良株として選択した。該上昇率は364倍であった。

参考例3 キメラ $G\alpha_s$ およびGal4-ERを発現し、レポータープラスミドを導入した宿主細胞GBCC13およびGBCRC6の造成

（1） Namalwa KJM-1細胞からRNeasy Mini Kit〔キアゲン（QIAGEN）社製〕を用いて全RNAを取得した。鋳型として該全RNAを $5 \mu\text{g}$ 使い、SUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR（インビトロジェン社製）により一本鎖cDNAを合成した。該一本鎖cDNAを水で50倍希釈し、PCRの鋳型として使用した。

上記一本鎖cDNA（ $10 \mu\text{L}$ ）に、 $G\alpha_s$ 遺伝子特異的プライマー（各 20pmol ）、 2.5nmol/L dNTP混合液を $4 \mu\text{L}$ 、ジメチルスルフォキシドを $2.5 \mu\text{L}$ 、5単位/ μL Pyrobest DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を $0.25 \mu\text{L}$ 、 $10\times$ 反応緩衝液（宝酒造社製）を $5 \mu\text{L}$ 添加し、滅菌水を加えて全量を $50 \mu\text{L}$ に調製した。 $G\alpha_s$ 遺伝子特異的プライマーとしては、配列番号14および15に記載した配列を有する合成DNAを

用いた。これらプライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびAsp718サイトが導入されている。サーマルサイクラーDNA engine (MJ Research社製) を用い、95°Cで5分間処理した後、94°Cで30秒間、65°Cで1分間、72°Cで2分間からなる反応を30サイクルの条件でPCRを行った。PCRにより増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。該増幅断片をHindIIIおよびAsp718で切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。

プラスミドpAMohをHindIIIおよびAsp718で切断後、HindIII-Asp718断片を取得した。

PCR断片由来のHindIII-Asp718断片、およびpAMoh由来のHindIII-Asp718断片を結合することにより、 $G\alpha_{s4}$ の発現プラスミドpAMoh-Gs4を造成した。

(2) プラスミドpAMoh-Gs-qの造成

$G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha_s$ (以下、 $G\alpha_{s-q}$ と呼ぶ) 発現プラスミドpAMoh-Gs-qを以下のように造成した。

上記(1)で構築したpAMoh-Gs4をXbaIとAsp718で切断することによりoriPを含むXbaI-Asp718断片を取得した。また、pAMoh-Gs4をXbaIで切断後、SphIで部分消化することにより、C末端を欠失した $G\alpha_{s4}$ をコードするXbaI-SphI断片を取得した。

配列番号16および17で表される塩基配列を有する合成DNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化後、アニールさせることにより、 $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸をコードする領域を含む二本鎖DNAを取得した。

該二本鎖DNA、pAMoh-Gs4由来のXbaI-Asp718断片およびXbaI-SphI断片を結合することにより、pAMoh-Gs-qを造成した。

(3) プラスミドpAMoh-Gs-iの造成

$G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha_s$ (以下、 $G\alpha_{s-i}$ と呼ぶ) 発現プラスミドpAMoh-Gs-iを以下のように造成した。

配列番号18および19で表される塩基配列を有する合成DNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化後、アニールさせることにより、 $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸をコードする領域を含む二本鎖DNAを取得した。該二本鎖DNA、上記(2)で取得したpAMoh-Gs4由来のXbaI-Asp718断片およびpAMoh-Gs4由来のXbaI-SphI断片を結合することにより、pAMoh-Gs-iを造成した。

(4) プラスミドpACRElucMoGs-qMoGs-iおよびpAMopGs-qMoGs-iの造成

$G\alpha_{s-q}$ および $G\alpha_{s-i}$ の発現プラスミドpAMopGs-qMoGs-i、ならびに $G\alpha_{s-q}$ および $G\alpha_{s-i}$ の発現プラスミドでありホタル・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミドでもあるpACRElucMoGs-qMoGs-iを以下のようにして構築した。

参考例2の(1)で造成したpACRElucをClaIで切断後、Klenow処理し、更にCpoIで切断することにより、oriPおよびCRE-ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分を含むCpoI-ClaI(平滑末端)断片を取得した。上記(3)で造成したpAMoh-Gs-iをBssHIIおよびCpoIで切断し、 $G\alpha_{s-i}$ をコードするBssHII-CpoI断片を取得した。pAGE248 [J. Biol. Chem. 269, 14730 (1994)] をXhoIで切断後、Klenow処理し、更にBssHIIで切断し、モロニー・マウス白血病ウイルスのLTRプロモーター [以下、Moプロモーターと略す] 配列の一部を含むXhoI(平滑末端)-BssHII断片を取得した。pACREluc由来のCpoI-ClaI(平滑末端)断片、pAMoh-Gs-i

由来のBssHII-CpoI断片、pAGE248由来のXhoI（平滑末端）-BssHII断片を結合し、プラスミドpACRElucMoGs-iを造成した。

上記（2）で造成したpAMoh-Gs-qをBssHIIおよびCpoIで切断し、G $\alpha_{s,q}$ をコードするBssHII-CpoI断片を取得した。pAMoh-Gs-q由来のBssHII-CpoI断片、ならびに上記で取得したpACREluc由来のCpoI-ClaI（平滑末端）断片およびpAGE248由来のXhoI（平滑末端）-BssHII断片を結合し、プラスミドpACRElucMoGs-qを造成した。

上記で造成したpACRElucMoGs-iを、NaeIおよびBssHIIで切断しMoプロモーターを含むNaeI-BssHII断片を、CpoIおよびBssHIIで切断しG $\alpha_{s,i}$ をコードするCpoI-BssHII断片を、それぞれ取得した。さらに上記で造成したpACRElucMoGs-qを、NheIおよびCpoIで切断しCRE-ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むNheI-CpoI断片を、NheIおよびNaeIで切断しG $\alpha_{s,q}$ をコードするNheI-NaeI断片を、それぞれ取得した。

これらpACRElucMoGs-i由来のNaeI-BssHII断片およびCpoI-BssHII断片、ならびにpACRElucMoGs-q由来のNheI-CpoI断片およびNheI-NaeI断片の4断片を結合し、プラスミドpACRElucMoGs-qMoGs-iを造成した。

造成したpACRElucMoGs-qMoGs-iプラスミドをSalIおよびNotIで消化後、Klenow処理し、SalI（平滑末端）-NotI（平滑末端）断片を取得した。該断片をセルフライゲーションすることにより、pACRElucMoGs-qMoGs-iからCREレポーターユニットを除去したプラスミドpAMohGs-qMoGs-iを造成した。

上記のpAMohGs-qMoGs-iをCpoIで切断後、Klenow処理し、更にAseIで切断することにより、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含まないCpoI（平滑末端化）-AseI断片を取得した。pPUR（クロンテック社製；GenBank Accession番号U07648）をBamHIで切断後、Klenow処理し、更にAseIで切断することにより、ピューロマイシン耐性遺伝子を含むBamHI（平滑末端）-AseI断片を取得した。このpPUR由来のBamHI（平滑末端）-AseI断片、および上記のpAMohGs-qMoGs-i由来のCpoI（平滑末端化）-AseI断片を結合し、pAMohGs-qMoGs-i中のハイグロマイシン耐性遺伝子を、ピューロマイシン耐性遺伝子で置き換えたpAMopGs-qMoGs-iを造成した。

（5）プラスミドpAMopGs-qMoGs-iをGBC7の染色体DNAに組み込んだ安定形質転換株の造成

上記（4）で造成したpAMopGs-qMoGs-i中のoriP内に1個所存在する制限酵素であるSpeIで切断したpAMopGs-qMoGs-iを1 μ g/ μ LになるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法により上記参考例2の（4）で造成した細胞株GBC7に、 1.6×10^6 細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換株を、8mLのRPMI1640-ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。

培養後、プラストサイジンS（2.0 μ g/mL）、ハイグロマイシンB（300 μ g/mL）、およびピューロマイシン（puromycin；シグマ社製）（2.0 μ g/mL）を添加し、更に7日間培養した。

培養後、該形質転換株の生細胞数を確認し、プラストサイジンS（2.0 μ g/mL）、ハイグロマイシンB（300 μ g/mL）、ピューロマイシン

(2.0 μ g/mL)、およびKJMG8 (1 \times 10⁶細胞/mL)を含むRPMI1640・ITPSG培地で、該形質転換株が150細胞/mLになるように希釈し、96穴プレートに分注(30細胞/穴)して培養を行い、93個の安定形質転換株(シングルクローン)を取得した。各形質転換株は、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL)、およびピューロマイシン (2.0 μ g/mL)を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

(6) 優れた性質を有する安定形質転換株(シングルクローン)の選択

上記(5)で取得した93クローンを96穴プレートにまき(1~2 \times 10⁴細胞/穴)、リポフェクトアミン(LipofectAMINE) 2000(インビトロジェン社製)を用いて、1型アンジオテンシンII受容体誘導発現プラスミドpAGal9-AT1(下記参考例4の(2)参照)を各クローンに導入し、形質転換株を取得した。遺伝子導入の具体的方法はリポフェクトアミン2000の説明書に従って行い、1穴当たりプラスミドを0.3 μ g、リポフェクトアミン2000を0.8 μ L使用した。

該形質転換株を1日培養した後に、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL)、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL)、ピューロマイシン (2.0 μ g/mL)、およびジェネティシン (500 μ g/mL)を添加し、37°Cで7日間培養した。各穴へE2(終濃度10nmol/L)を添加し、更に1日間培養した。各穴へアンジオテンシンII(ペプチド研究所社製)(終濃度100nmol/L)を添加し、6時間培養後、参考例2の(4)の方法を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、アンジオテンシンIIで刺激しない場合の活性を調べた。以上の結果、アンジオテンシンIIに反応して高いホタル・ルシフェラーゼ活性を示した10クローンを選択した。

該10クローンに、再度pAGal9-AT1をエレクトロポレーション法により、1.6 \times 10⁶細胞あたり4 μ g導入し、形質転換株を取得した。

該形質転換株を8mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。

培養後、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL)、ピューロマイシン (2.0 μ g/mL)、およびジェネティシン (500 μ g/mL)を添加し、更に14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL)、ピューロマイシン (2.0 μ g/mL)、およびジェネティシン (500 μ g/mL)を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

各形質転換株にE2(終濃度10nmol/L)を添加して24時間培養後、アンジオテンシンII(終濃度100nmol/L)を添加し、更に6時間培養後、参考例2の(4)に記載した方法を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、E2で刺激しない場合の活性、およびアンジオテンシンIIで刺激しない場合の活性を測定した。E2で刺激した時にのみアンジオテンシンIIに反応して高いホタル・ルシフェラーゼ活性(85倍)を示したGBCC13を優良株として選択した。

(7) プラスミドpAMopGs-qMoGs-iをGBCR2の染色体DNAに組み込んだ安定形質転換株の造成

上記(5)に記載した方法に準じて、(4)で造成したpAMopGs-qMoGs-iを上記参考例2の(6)で造成した細胞株GBCR2に導入することにより、94個の安定形質転換株(シングルクローン)を取得した。各形質転換株は、プラストサイジ

ンS (2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL)、およびピューロマイシン (2.0 μ g/mL) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

(8) 優れた性質を有する安定形質転換株 (シングルクローン) の選択

上記 (7) で取得したクローンの中から優れた性質を有するクローンの選択を行った。ホタル・ルシフェラーゼの活性を測定する代わりにウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性を測定する以外は、上記 (6) に記載した方法に準じた。ウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性は、参考例 2 の (7) に記載した方法に準じて測定した。

上記 (7) で取得した各クローンにpAGal9-AT1を導入し、形質転換細胞を取得した。各形質転換細胞をE2で処理後、アンジオテンシンIIで刺激してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、アンジオテンシンIIで刺激しない場合の活性を測定した。アンジオテンシンIIに反応して高いウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示した13クローンを選択した。

該13クローンに再度pAGal9-AT1をエレクトロポレーション法により導入し、形質転換細胞を取得した。各形質転換細胞をE2で処理後、アンジオテンシンIIで刺激してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、E2で刺激しない場合の活性、およびアンジオテンシンIIで刺激しない場合の活性を測定した。E2で刺激した時にのみアンジオテンシンIIに反応して高いウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性 (132倍) を示したGBCRC6を優良株として選択した。

参考例 4 各種GPCR誘導発現プラスミドおよびGPR88誘導発現プラスミドの造成

(1) 2型バソプレッシン受容体 (V2) 誘導発現プラスミドpAGal9-V2の造成

鋳型として、ヒト腎臓由来のmRNA (1 μ g; クロンテック社製) から調製した一本鎖cDNAを、V2遺伝子特異的プライマーとして配列番号20および21に記載した配列を有する合成DNAを用い、PCRによりV2遺伝子を取得した。V2遺伝子特異的プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびAsp718サイトが導入されている。

得られたV2遺伝子増幅断片をHindIIIおよびAsp718で切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。

プラスミドpAGal9-dをHindIIIおよびAsp718で切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。

上記V2遺伝子増幅断片由来のHindIII-Asp718断片およびpAGal9-d由来のHindIII-Asp718断片を結合することにより、V2の誘導発現プラスミドpAGal9-V2を造成した。

(2) 1型アンジオテンシンII受容体 (AT1) 誘導発現プラスミドpAGal9-AT1の造成

プラスミドpAR1.8 [Nature, 351, 230 (1991)] をHindIIIおよびNotIで切断し、ウシAT1遺伝子を含むHindIII-NotI断片を取得した。

参考例 1 の (2) で造成したpAGal9-lucをHindIIIおよびNotIで切断し、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含まないHindIII-NotI断片を取得した。

pAR1.8由来のHindIII-NotI断片、およびpAGal9-luc由来のHindIII-NotI断片を結合し、pAGal9-AT1を造成した。

(3) GPR12の誘導発現プラスミドの造成

鋳型として、ヒト脳梁由来のmRNA (1 μ g; クロンテック社製) から調製した一本鎖cDNAを、構成活性型GPCRであるGPR12遺伝子 [Genomics, 28, 347 (1995)、GenBank登録番号: U18548] 特異的プライマーとして配列番号22または23に記載した配列を有する合成DNAを用い、PCRによりGPR12遺伝子を取得した。DNAポリメラーゼとしては、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績社製) を用いた。PCRを行う際の緩衝液としては、使用する酵素に付加された10倍濃度の緩衝液を使用した。PCRは、サーマルサイクラーDNA Engine [MJリサーチ (MJ Research) 社製] を用い、95℃で5分間の処理後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間からなる反応を30サイクル行った。

GPR12遺伝子特異的プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびNotIサイトが導入されている。増幅断片をHindIIIとNotIで切断後、GPR12遺伝子を含む断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。該切断断片を、プラスミドpAGal9-ndの対応する制限酵素サイト (HindIII-NotI) 間へ組み込むことにより、誘導発現プラスミドpAGal9-GPR12を構築した。

プラスミドに組み込んだDNA断片の配列を決定し、GPR12をコードしていることを確認した。すなわち、pAGal9-nd中の配列に特異的なプライマー (配列番号24および25に示した配列を有する合成DNA) を用いて、該cDNAの5' 側および3' 側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、パーキン・エルマー社のDNAシーケンサー377と反応キット (ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; アプライド・バイオシステムズ社製) を使用した。

(4) GPR88の誘導発現プラスミドの造成

鋳型としてヒト染色体DNA (100ng; クロンテック社製) を、ヒトGPR88遺伝子 (配列番号1) 特異的プライマーとして配列番号26および27に記載した配列を有する合成DNAを用い、PCRによりGPR88遺伝子を取得した。DNAポリメラーゼとしては、PLATINUM Pfx DNAポリメラーゼ (インビトロジェン社製) を用いた。PCRを行う際の緩衝液としては、使用する酵素に付加された10倍濃度の緩衝液を使用した。PCRは、サーマルサイクラーDNA Engine (MJリサーチ社製) を用い、98℃で2分間の処理後、98℃で15秒間、62℃で30秒間、68℃で1分間からなる反応を30サイクル行った。GPCR88遺伝子特異的プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびXhoIサイトが導入されている。増幅断片をXhoIで切断し、Klenow処理した後にHindIIIで切断し、GPCR88遺伝子を含むHindIII-XhoI (平滑末端) 断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。プラスミドpAGal9-ndを、NotIで切断し、Klenow処理した後にHindIIIで切断し、HindIII-NotI (平滑末端) 断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。PCRにより得られたGPR88遺伝子を含むHindIII-XhoI (平滑末端) 断片とpAGal9-nd由来のHindIII-NotI (平滑末端) 断片とを結合することにより、GPR88誘導発現プラスミドpAGal9-GPR88を構築した。

上記(3)に記載の方法に準じてプラスミドpAGal9-ndに組み込んだDNA断片

の配列を決定し、GPCR88をコードしていることを確認した。

参考例5 KJMGER8を宿主としたGPR88のアッセイ細胞の構築と利用

参考例4の(4)で構築したGPR88誘導発現プラスミドpAGal9-GPR88

(2 μ g)、および参考例3の(4)で構築した $G\alpha_{s-q}$ および $G\alpha_{s-i}$ 発現プラスミド兼レポータープラスミドpACRElucMoGs-qMoGs-i (2 μ g)を、エレクトロポレーション法により、 1.6×10^6 細胞の参考例1の(4)で選択した細胞株KJMGER8に共導入した。該形質転換株を8mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。培養後、プラストサイジンS

(2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL) およびジェネティシン (500 μ g/mL) を添加し、更に14日間培養して安定形質転換株 (GPR88アッセイ細胞1と呼ぶ) を取得した。該形質転換株は、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL) およびジェネティシン (500 μ g/mL) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

同様に、参考例1の(3)で造成したコントロールプラスミドpAGal9-nd (2 μ g)ならびに参考例3の(4)で造成した $G\alpha_{s-i}$ および $G\alpha_{s-q}$ 発現プラスミド兼レポータープラスミドpACRElucMoGs-qMoGs-i (2 μ g)をKJMGER8に共導入し、安定形質転換株 (以下、コントロール細胞1と呼ぶ) を取得した。

GPR88アッセイ細胞1およびコントロール細胞1をそれぞれ96穴プレートに分注し (約 1×10^4 個/穴)、37℃で1日間培養した。各穴へE2 (終濃度10nmol/L) を添加してさらに1日間培養後、Steady Glo Luciferase Assay System (プロメガ社製) を添加し、トップカウント (パッカード社製) を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。また、E2を添加しないで同様の実験を行い、ホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。

E2を添加した場合の活性を添加しない場合の活性で割った値を誘導倍率とした。コントロール細胞1における誘導倍率は約1であった。一方、GPR88アッセイ細胞1の誘導倍率は約4~6倍であった。GPR88は、誘導発現するだけでシグナルを流すことから、構成活性型GPCRであることがわかった。

参考例6 GBCC13を宿主としたGPR88のアッセイ細胞の構築と利用

参考例4の(4)で構築したGPR88誘導発現プラスミドpAGal9-GPR88

(4 μ g)を、エレクトロポレーション法により 1.6×10^6 細胞の参考例3の(6)で選択した細胞株GBCC13に導入した。該形質転換株を8mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。培養後、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB (300 μ g/mL)、ピューロマイシン (2.0 μ g/mL) およびジェネティシン (500 μ g/mL) を添加し、更に14日間培養して安定形質転換株 (GPR88アッセイ細胞2と呼ぶ) を取得した。該形質転換株は、プラストサイジンS (2.0 μ g/mL)、ハイグロマイシンB

(300 μ g/mL)、ピューロマイシン (2.0 μ g/mL) およびジェネティシン (500 μ g/mL) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

同様に、参考例1の(3)で造成したコントロールプラスミドpAGal9-nd (4 μ g)をGBCC13に導入し、安定形質転換株 (コントロール細胞2と呼ぶ) を取得した。

GPR88アッセイ細胞2またはコントロール細胞2を96穴プレートに分注し (約

1×10⁴個/穴)、37℃で1日間培養した。各穴へE2(終濃度10nmol/L)を添加してさらに1日間培養後、Steady Glo Luciferase Assay System (Promega社製)を添加し、トップカウント(Packard社)を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。また、E2を添加しないで同様の実験を行い、ホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。

E2を添加した場合の活性を添加しない場合の活性で割った値を誘導倍率とした。コントロール細胞2における誘導倍率は約1であった。一方、GPR88アッセイ細胞2の誘導倍率は約4-18倍であった。GPR88は、誘導発現するだけでシグナルを流すことから、構成活性型GPCRであることがわかった。

参考例7 GBCRC6を宿主としたGPR88のアッセイ細胞の構築

参考例3で構築したGBCRC6に、任意のGPCRの誘導発現プラスミドを導入することにより任意のGPCRのアッセイ細胞を構築することができる。

参考例4の(4)で造成したGPR88誘導発現プラスミドpAGal9-GPR88

(4 μg)を、エレクトロポレーション法により1.6×10⁶細胞のGBCRC6に導入した。該形質転換株を8mLのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。培養後、プラストサイジンS(2.0 μg/mL)、ハイグロマイシンB(300 μg/mL)、ピューロマイシン(2.0 μg/mL)およびジェネティシン(500 μg/mL)を添加し、更に14日間培養して安定形質転換株(GPR88アッセイ細胞3と呼ぶ)を取得した。該形質転換株は、プラストサイジンS(2.0 μg/mL)、ハイグロマイシンB(300 μg/mL)、ピューロマイシン(2.0 μg/mL)およびジェネティシン(500 μg/mL)を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

同様に、参考例1の(3)で造成したコントロールプラスミドpAGal9-nd(4 μg)をGBCRC6に導入し、安定形質転換株(コントロール細胞3と呼ぶ)を取得した。

GPR88アッセイ細胞3またはコントロール細胞3を96穴プレートに分注し(約1×10⁴個/穴)、37℃で1日間培養する。各穴へE2(終濃度10nmol/L)を添加してさらに1日間培養後、セレンテラジンh(モレキュラー・プローブズ社)(終濃度250nmol/L)を添加してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。活性測定には、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタ(ワラック・ベルトールド・ジャパン社製)またはFDSS6000(浜松ホトニクス社製)を用いた。また、E2を添加しないで同様の実験を行い、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。E2を添加した場合の活性を添加しない場合の活性で割った値を誘導倍率とした。

コントロール細胞3における誘導倍率は約1であった。一方、GPR88アッセイ細胞3の誘導倍率は約15-40倍であった。GPR88は、誘導発現するだけでシグナルを流すことから、構成活性型GPCRであることがわかった。

参考例8 4-クロロ-5-シアノ-2-メチルチオピリミジンの合成

工程1: 5-シアノ-3,4-ジヒドロ-2-メチルチオピリミジン-4-オン・ナトリウム塩の合成

硫酸メチルイソチオ尿素(90.5 g, 0.325 mmol)を水酸化ナトリウム水溶液(2 mol/L, 325 mL)に溶解し、氷冷下、その水溶液に2-エトキシメチレン-2-シア

ノ酢酸エチル (100 g, 0.591 mmol) のエタノール溶液 (350 mL) を、内温が 15℃を超えないように注意しながら少しずつ滴下した。全てのエタノール溶液を加えた後、水酸化ナトリウム水溶液 (2 mol/L, 300 mL) を少しずつ加え、さらにエタノール (150 mL) を加え、室温にて一晩攪拌した。反応混合物中に析出した結晶を濾取し、エタノール (500 mL) で洗浄した。得られた白色結晶を減圧乾燥することで、5-シアノ-3,4-ジヒドロ-2-メチルチオピリミジン-4-オン・ナトリウム塩 (113.3 g, 収率100%) を得た。

工程2：4-クロロ-5-シアノ-2-メチルチオピリミジンの合成

上記で得た5-シアノ-3,4-ジヒドロ-2-メチルチオピリミジン-4-オン (30.0 g, 0.159 mmol) にオキシ塩化リン (150 mL) を加え、7時間加熱還流を行った。反応混合物を放冷した後、オキシ塩化リンを減圧留去した。得られた残渣を氷 (約 1000 mL) にあけ、析出した淡黄色固体を濾取し、水で洗浄した。その固体を減圧乾燥することで、4-クロロ-5-シアノ-2-メチルチオピリミジン (11.9 g, 収率40%) を得た。

参考例9：2-ベンジル-N-メチルアニリンの合成

工程1：2-ベンジルトリフルオロアセトアニリドの合成

2-ベンジルアニリン (5.00 g, 27.3 mmol) をジクロロメタン (100 mL) に溶解し、その溶液に-20℃にてトリエチルアミン (7.6 mL, 55 mmol) および無水トリフルオロ酢酸 (4.17 mL, 30.0 mmol) を加え、30分間攪拌した。室温にて1時間攪拌した後、反応液をジクロロメタンで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、淡黄色結晶として2-ベンジルトリフルオロアセトアニリド (7.51 g, 26.9 mmol, 収率99%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 4.00 (s, 2 H), 7.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 2 H), 7.23-7.40 (m, 6 H), 7.79 (br s, 1 H), 7.81 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H)

工程2：2-ベンジル-N-メチルトリフルオロアセトアニリドの合成

工程1で得られた2-ベンジルトリフルオロアセトアニリド (7.51 g, 26.9 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (50 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液に炭酸カリウム (7.54 g, 54.6 mmol) およびヨウ化メチル (3.40 mL, 54.6 mmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、2-ベンジル-N-メチルトリフルオロアセトアニリド (7.49 g, 25.6 mmol, 収率95%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 3.13 (s, 3 H), 3.94 (s, 2 H), 7.11-7.35 (m, 9 H)

工程3：2-ベンジル-N-メチルアニリンの合成

工程2で得られた2-ベンジル-N-メチルトリフルオロアセトアニリド (7.49 g, 25.6 mmol) をメタノール (50 mL) に溶解し、その溶液に炭酸カリウム (7.54 g, 54.6 mmol) を加え、加熱還流下、5時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、2-ベンジル-N-メチルアニリン (4.70 g, 23.8 mmol, 収率92%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.74 (s, 3 H), 3.50 (br s, 1 H), 3.85 (s, 2 H), 6.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 6.71 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 7.01 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 7.13-7.29 (m, 6 H)

参考例 10: ベンゾトリアゾール-1-イル 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボキシラートの合成

工程 1: エチル 4-(ベンジルフェニルアミノ)-2-メチルチオ-5-ピリミジンカルボキシラートの合成

市販のエチル 4-クロロ-2-メチルチオ-5-ピリミジンカルボキシレート (15.0 g, 64.5 mmol) を 1,2-ジメトキシエタン (150 mL) に溶解し、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン (27.6 mL, 161 mmol) および 2-ベンジルアニリン (13.0 g, 70.9 mmol) を加え、加熱還流下 18 時間攪拌した。反応液を減圧留去し、酢酸エチルで希釈した。有機層を水、5%クエン酸水溶液および飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をエタノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (19.6 g, 51.6 mmol, 収率 80%) を得た。

^1H -NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.38 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.36 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 4.34 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.10-7.27 (m, 8H), 7.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 10.00 (br s, 1H)

APCI-MS: m/z 380 ($M+H$) $^+$

工程 2: エチル 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボキシラートの合成

工程 1 で得られたエチル 4-(ベンジルフェニルアミノ)-2-メチルチオ-5-ピリミジンカルボキシレート (5.00 g, 13.2 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、氷冷下 m -クロ濾過安息香酸 (含量 65%, 2.70 g, 15.6 mmol) を 10 分間かけて加え、室温で 30 分間攪拌した。さらに氷冷下 m -クロ濾過安息香酸 (含量 65%, 1.13 g, 7.53 mmol) を 5 分間かけて加え、室温で 20 分間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を 1,2-ジメトキシエタン (50 mL) に溶解し、シクロヘキシルメチルアミン (2.57 mL, 19.8 mmol) を加え、加熱還流下 2.5 時間攪拌した。反応液を減圧留去し、得られた残渣をエタノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (4.87 g, 11.0 mmol, 収率 83%) を得た。

^1H -NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 0.74-0.98 (m, 2H), 1.01-1.24 (m, 3H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.40-1.73 (m, 6H), 3.06 (br s, 2H), 3.98 (s, 2H), 4.25 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.06-7.24 (m, 8H), 7.40 (br, 1H), 7.95 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.52 (br s, 1H), 9.85 (br s, 1H)

APCI-MS: 445 ($M+H$) $^+$

IR(KBr): 2468, 2458, 1666, 1629, 1608, 1577, 1546, 1521, 1502, 1494, 1463, 1446, 1430, 1394, 1390, 1369 cm^{-1}

工程 3: 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸の合成

工程 2 で得られたエチル 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシ

ルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラート (1.00 g, 2.25 mmol) をエタノール (7 mL) に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (7.00 mL, 7.00 mmol) を加え、60℃で4時間攪拌した。次いでエタノール (7 mL) および4 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (1.00 mL, 4.00 mmol) を加え、加熱還流下、30分間攪拌した。さらに4 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (1.00 mL, 4.00 mmol) を加え、加熱還流下、2時間攪拌した。反応液を半分の体積まで減圧濃縮し、1 mol/L 塩酸水溶液で反応液のpHを4.5に調整した。析出した結晶を濾取することにより白色結晶として標記化合物 (0.99 g, 2.2 mmol, 定量的収率) を得た。

¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 0.78-0.99 (m, 2H), 1.03-1.29 (m, 3H), 1.47-1.81 (m, 6H), 3.07 (br s, 2H), 4.03 (s, 2H), 6.89-7.10 (m, 1H), 7.12-7.35 (m, 8H), 7.50 (br s, 1H), 8.40 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 11.97 (br s, 1H)

APCI-MS: m/z 417 (M+H)⁺

IR(KBr): 2918, 2841, 1664, 1655, 1649, 1637, 1632, 1610, 1589, 1578, 1570, 1552, 1541, 1535, 1510, 1454, 1417, 1381, 1362 cm⁻¹

工程4: ベンゾトリアゾール-1-イル 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラートの合成

工程3で得られた 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (5.00 g, 12.0 mmol) をクロロホルム (50 mL) に溶解し、氷冷下、N-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (4.60 g, 24.0 mmol) および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.30 g, 24.4 mmol) を加え、室温で5時間攪拌した。さらにN-エチル-N'- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (2.30 g, 12.0 mmol) および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1.60 g, 12.0 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、5%クエン酸水溶液および飽和重曹水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去することにより淡黄色結晶として標記化合物 (5.67 g, 10.6 mmol, 収率 89%) を得た。この化合物は更なる精製を行うことなく次工程に用いた。

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.76-1.08 (m, 2H), 1.09-1.33 (m, 3H), 1.43-1.82 (m, 6H), 3.14 (t, J = 6.5 Hz, 1.5H), 3.35 (t, J = 6.3 Hz, 0.5H), 3.92 (s, 0.5H), 3.93 (s, 1.5H), 5.47 (t, J = 5.9 Hz, 0.25H), 5.89 (t, J = 5.9 Hz, 0.75H), 6.99-7.30 (m, 9H), 7.42-7.60 (m, 2H), 7.68 (d, J = 7.9 Hz, 0.25H), 7.80 (d, J = 7.9 Hz, 0.75H), 8.10 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.95 (s, 0.75H), 9.03 (br s, 0.25H), 9.08 (s, 0.25H), 9.19 (br s, 0.75H)

実施例1: 化合物1 [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -5- (2H-テトラゾール-5-イル) ピリミジン] の合成

工程1: 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5-シアノ-2-メチルチオピリミジンの合成

参考例8で得られた4-クロロ-5-シアノ-2-メチルチオピリミジン (800 mg, 4.31 mmol) をテトラヒドロフラン (8 mL) に溶解し、その溶液に2-ベンジルアニリン (869 mg, 4.74 mmol) およびトリエチルアミン (0.90 mL, 6.46 mmol) を加え、室温にて24時間攪拌した。反応液を水で希釈し、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去

した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、淡黄色結晶として4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-シアノ-2-メチルチオピリミジン (1.15 g, 3.46 mmol, 収率80%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.34 (s, 3 H), 4.00 (s, 2 H), 6.85 (br s, 1 H), 7.12-7.32 (m, 8 H), 7.61 (d, $J=6.3$ Hz, 1 H), 8.27 (s, 1 H)

工程2: 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-シアノ-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジンの合成

工程1で得られた4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-シアノ-2-メチルチオピリミジン (1.15 g, 3.46 mmol) をジクロロメタン (20 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液にメタクロ濾過安息香酸 (65%, 1.38 g, 5.2 mmol) を5分間かけて加え、室温にて5時間攪拌した。反応液を飽和重曹水で希釈し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をテトラヒドロフラン (20 mL) に溶解し、その溶液にシクロヘキシルメチルアミン (0.54 mL, 4.15 mmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応液を水で希釈し、析出した結晶を濾取することにより、淡黄色結晶の4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-シアノ-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン (1.21 g, 3.04 mmol, 収率88%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.76-1.02 (m, 2 H), 1.05-1.34 (m, 3 H), 1.36-1.91 (m, 6 H), 3.07 (t, $J=6.4$ Hz, 0.63 H), 3.24 (t, $J=6.4$ Hz, 0.37 H), 3.98 (s, 0.74 H), 4.01 (s, 1.26 H), 5.24 (br s, 0.37 H), 5.59 (br s, 0.63 H), 6.56 (br s, 0.37 H), 6.70 (br s, 0.63 H), 7.06-7.42 (m, 8 H), 7.60 (d, $J=7.6$ Hz, 0.37 H), 7.76 (d, $J=7.9$ Hz, 0.63 H), 8.12 (s, 0.63 H), 8.23 (s, 0.37 H)

APCI-MS: m/z 396 ($\text{M}^+ - \text{H}^+$)

工程3: 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-(2H-テトラゾール-5-イル)ピリミジンの合成

工程2で得られた4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-シアノ-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン (1.00 g, 2.52 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (8 mL) に溶解し、その溶液に塩化アンモニウム (404 mg, 7.55 mmol) およびアジ化ナトリウム (491 mg, 7.55 mmol) を加え、100°Cにて5時間攪拌した。反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液で希釈し、析出した結晶を濾取した。得られた粗結晶を酢酸エチルとヘキサンの混合溶媒から再結晶することにより、淡黄色結晶として化合物1 (693 mg, 1.57 mmol, 収率62%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 0.74-0.99 (m, 2 H), 1.01-1.25 (m, 3 H), 1.40-1.73 (m, 6 H), 3.05 (br s, 2 H), 4.04 (s, 2 H), 7.08-7.30 (m, 9 H), 7.60 (br s, 1 H), 7.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1 H), 8.61 (s, 1 H), 10.36 (br s, 1 H).

APCI-MS: m/z 439 ($\text{M}^+ - \text{H}^+$)

IR(KBr): 2922, 2891, 1655, 1647, 1637, 1593, 1570, 1560, 1541, 1527, 1508, 1483, 1454 cm^{-1}

また、対応する塩酸塩は以下の方法に従って調製した。

上記の化合物1 (1.56 g, 3.54 mmol) をエタノール (30 mL) に懸濁し、その懸濁液に塩化水素酢酸エチル溶液 (4 mol/L, 9.00 mL, 36.0 mmol) を加え、室温にて2時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、エタノールから再結晶することによ

り、化合物1の1塩酸塩 (1.59 g, 3.33 mmol, 収率94%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 主なピークとして0.65-1.00 (m, 2 H), 1.01-1.30 (m, 3 H), 1.31-1.81 (m, 6 H), 2.95 (t, $J = 5.9$ Hz, 0.8 H), 3.19 (t, $J = 5.9$ Hz, 0.2 H), 4.05 (s, 2 H), 6.99-7.20 (m, 5 H), 7.22-7.42 (m, 3 H), 7.63 (d, $J = 5.9$ Hz, 0.8 H), 7.72 (d, $J = 5.9$ Hz, 0.2 H), 8.62 (br s, 0.8 H), 8.82 (s, 1 H), 8.88 (br s, 0.2 H), 10.62 (s, 0.2 H), 10.68 (s, 0.8 H)

APCI-MS: m/z 441 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

IR (KBr): 1684, 1670, 1662, 1653, 1649, 1635, 1630, 1593, 1572, 1560, 1541, 1524, 1497, 1473, 1458, 1412, 1367 cm^{-1}

実施例2: 化合物2~化合物36の合成

工程1: 化合物Fの合成



(F)

(式中、 R^1 およびAはそれぞれ前記と同義である)

参考例8で得られた4-クロロ-5-シアノ-2-メチルチオピリミジン (0.25 mol/L クロロホルム溶液, 0.20 mL, 0.050 mmol) と R^1ArNH (式中、 R^1 およびArはそれぞれ前記と同義である) で表される化合物E (1.0 mol/L クロロホルム溶液, 0.060 mL, 0.060 mmol) の混合液に、モルホリノメチルポリスチレン (35 mg, 0.12 mmol) を加え、50℃にて1日間攪拌した。反応混合物にベンゾイルクロリドポリマーバウンド (23 mg, 0.058 mmol) およびクロロホルム (0.50 mL) を加え、室温にてさらに1日間攪拌した。反応混合物中の樹脂を濾別し、樹脂をクロロホルムとメタノールの混合溶媒 (クロロホルム/メタノール=3/1, 1.2 mL) で洗浄した。得られた溶液を全て合わせ、溶媒を留去して化合物Fを得た。

工程2: 化合物Gの合成

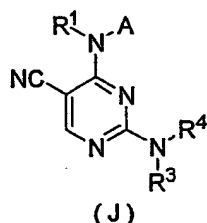


(G)

(式中、 R^1 、Aおよびmはそれぞれ前記と同義である)

工程1で得られた化合物Fをジクロロメタン (0.20 mL) に溶解し、その溶液にメタクロ濾過安息香酸 (0.50 mol/L ジクロロメタン溶液, 0.125 mL, 0.063 mmol) を加え、室温にて0.5~1時間攪拌した。反応混合物に飽和重曹水 (0.20 mL) を加えて分液した。有機層を飽和重曹水 (0.20 mL) で洗浄し、硫酸マグネシウムと珪藻土の混合物 (硫酸マグネシウム/珪藻土=1/1, 140 mg) を加えて攪拌した。硫酸マグネシウムと珪藻土の混合物を濾別し、硫酸マグネシウムと珪藻土の混合物をジクロロメタン (0.80 mL) で洗浄した。得られた溶液を全て合わせ、溶媒を留去して化合物Gを得た。

工程3：化合物Jの合成



(式中、R¹、A、R³およびR⁴はそれぞれ前記と同義である)

工程2で得られた化合物Gをテトラヒドロフラン (0.20 mL) に溶解し、その溶液にR³R⁴NH (式中、R³およびR⁴はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物H (1.0 mol/L クロロホルム溶液, 0.060 mL, 0.060 mmol) を加え、室温にて1日間攪拌した。反応混合物にクロロホルム (0.40 mL)、ベンゾイルクロリドポリマーバウンド (23 mg, 0.058 mmol)、ポリ4-ビニルピリジン (23 mg) を加え、室温にて1日間攪拌した。反応混合物中の樹脂を濾別し、樹脂をクロロホルムとメタノールの混合溶媒 (クロロホルム/メタノール=3/1, 1.4 mL) で洗浄した。得られた溶液を全て合わせ、溶媒を留去して化合物Jを得た。

工程4：化合物2～化合物36の合成

工程3で得られた化合物JをN,N-ジメチルホルムアミド (0.10 mL) に溶解し、その溶液にアジ化アンモニウムのN,N-ジメチルホルムアミド溶液 (1.0 mol/L, 0.080 mL, 0.080 mmol) を加え、100℃にて1日間攪拌した。反応液から溶媒を留去し、残渣をクロロホルムと1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロピルアルコールの混合溶媒 (クロロホルム/1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロピルアルコール=3/1, 0.40 mL) に溶解し、5%クエン酸水溶液で洗浄した。有機層を濃縮した後、残渣をエタノール (0.300 mL) に溶解し、その溶液にイオン交換樹脂AG 1-X8 (バイオラッド社製) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応混合物中の樹脂を濾取し、樹脂をメタノール (0.60 mL) で洗浄した後、樹脂にクロロホルムとメタノールの混合溶媒 (クロロホルム/メタノール=1/1, 0.40 mL) 次いで塩化水素の酢酸エチル溶液 (4 mol/L, 0.050 mL) を加え、目的物を溶出した。さらに樹脂をクロロホルムとメタノールの混合溶媒 (クロロホルム/メタノール=1/1, 1.2 mL) で洗浄し、得られた溶出液と洗浄液を合わせて濃縮し、目的とする化合物2～化合物36をそれぞれ通算収率約30%で得た。

得られた化合物2～化合物36はそれぞれ質量分析により同定した。各化合物の分析結果は第1表に機器データとして記載する。

実施例3：化合物37 [4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸] の合成

工程1：4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸エチルの合成

市販の4-クロロ-2-メチルチオピリミジン-5-イルカルボン酸エチル (15.0 g, 64.5 mmol) を1,2-ジメトキシエタン (150 mL) に溶解し、その溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン (27.6 mL, 161 mmol) および2-ベンジルアニリン (13.0 g, 70.9 mmol) を加え、加熱還流下、18時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルで希釈した後、水を加えて分液した。有機層を5%クエン酸

水溶液および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をエタノールから再結晶することにより、白色結晶として4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸エチル (19.6 g, 51.6 mmol, 収率80%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.38 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 2.36 (s, 3 H), 4.02 (s, 2 H), 4.34 (q, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 7.10-7.27 (m, 8 H), 7.82 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 8.70 (s, 1 H), 10.00 (br s, 1 H)

APCI-MS : m/z 380 ($M + H$) $^+$

工程2 : 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸エチルの合成

工程1で得られた化合物 (5.0 g, 13.2 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液にメタクロ濾過安息香酸 (2.70 g, 15.6 mmol) を10分間かけて加え、室温にて30分間攪拌した。さらに氷冷下、反応液にメタクロ濾過安息香酸 (1.13 g, 7.53 mmol) を5分間かけて加え、室温にて20分間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水を加えて分液した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を1,2-ジメトキシエタン (50 mL) に溶解し、その溶液にシクロヘキシルメチルアミン (2.57 mL, 19.8 mmol) を加え、加熱還流下、2.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をエタノールから再結晶することにより、白色結晶として4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸エチル (4.87 g, 11.0 mmol, 収率83%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 0.74-0.98 (m, 2 H), 1.01-1.24 (m, 3 H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.40-1.73 (m, 6 H), 3.06 (br s, 2 H), 3.98 (s, 2 H), 4.25 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 7.06-7.24 (m, 8 H), 7.40 (br s, 1 H), 7.95 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 8.52 (br s, 1 H), 9.85 (br s, 1 H)

APCI-MS : m/z 445 ($M + H$) $^+$

IR(KBr) : 2468, 2458, 1666, 1629, 1608, 1577, 1546, 1521, 1502, 1494, 1463, 1446, 1430, 1394, 1390, 1369 cm^{-1}

工程3 : 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸の合成

工程2で得られた化合物 (1.00 g, 2.25 mmol) をエタノール (7 mL) に溶解し、その溶液に水酸化ナトリウム水溶液 (1.0 mol/L, 7.0 mL, 6.5 mmol) を加え、60°Cにて4時間攪拌した。反応液にエタノール (7 mL) および水酸化ナトリウム水溶液 (4.0 mol/L, 1.0 mL, 4.0 mmol) を加え、加熱還流下、30分間攪拌した。さらに反応液に水酸化ナトリウム水溶液 (4.0 mol/L, 1.0 mL, 4.0 mmol) を加え、加熱還流下、2時間攪拌した。反応液を半分の体積まで減圧濃縮し、塩酸

(1.0 mol/L) で反応液のpH値を4.5に調整した。析出した結晶を濾取し、白色結晶として化合物3.7 (0.990 g, 2.25 mmol, 定量的収率) を得た。

^1H NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 0.78-0.99 (m, 2 H), 1.03-1.29 (m, 3 H), 1.47-1.81 (m, 6 H), 3.07 (br s, 2 H), 4.03 (s, 2 H), 6.89-7.10 (m, 1 H), 7.12-7.35 (m, 8 H), 7.50 (br s, 1 H), 8.40 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 8.48 (s, 1 H), 11.97 (br s, 1 H)

APCI-MS : m/z 417 ($M + H$)⁺

また、対応するナトリウム塩は以下の方法に従って調製した。

上記で得られた化合物 37 (1.7 g, 4.08 mmol) をテトラヒドロフラン (5 mL) に溶解し、その溶液に水酸化ナトリウム水溶液 (1.0 mol/L, 4.1 mL, 4.1 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣を水で再結晶化することにより、白色結晶として化合物 37 の1ナトリウム塩 (1.69 g, 3.85 mmol, 収率94%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 0.76-1.00 (m, 2 H), 1.02-1.32 (m, 3 H), 1.44-1.90 (m, 6 H), 3.07 (br s, 2 H), 4.03 (s, 2 H), 6.79-7.49 (m, 9 H), 8.47 (s, 1 H), 8.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 13.08 (br s, 1 H)

APCI-MS : m/z 417 ($M + H$)⁺

IR(KBr) : 3045, 2991, 2966, 2954, 2933, 2914, 2846, 1664, 1631, 1610, 1592, 1577, 1552, 1539, 1535, 1510 cm^{-1}

実施例 4 : 化合物 38 [4- [(2-ベンジルフェニル) (メチル)アミノ] -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸] の合成

工程 1 : 4- [(2-ベンジルフェニル) (メチル)アミノ] -2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸エチルの合成

市販の4-クロロ-2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸エチル (3.90 g, 16.8 mmol) を1,2-ジメトキシエタン (30 mL) に溶解し、その溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン (7.8 mL, 46 mmol) および参考例 2 で得られた2-ベンジル-N-メチルアニリン (3.0g, 15 mmol) を加え、加熱還流下、24時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した。得られた残渣に酢酸エチルおよび水を加えて分液した後、有機層を5%クエン酸水溶液および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を2-プロパノールから再結晶することにより、白色結晶として4- [(2-ベンジルフェニル) (メチル)アミノ] -2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸エチル (5.06 g, 12.9 mmol, 収率77%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 1.04 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 3.18 (s, 3 H), 3.70 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.80 (s, 2 H), 7.07-7.29 (m, 9 H), 8.19 (s, 1 H)

工程 2 : 4- [(2-ベンジルフェニル) (メチル)アミノ] -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸エチルの合成

工程 1 で得られた4- [(2-ベンジルフェニル) (メチル)アミノ] -2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸エチル (3.00 g, 7.62 mmol) をジクロロメタン (30 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液にメタクロ濾過安息香酸 (1.57 g, 9.15 mmol) を5分間かけて加え、室温にて30分間攪拌した。さらに氷冷下、反応液にメタクロ濾過安息香酸 (0.65 g, 3.8 mmol) を加え、室温にて30分間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水を加えて分液した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を1,2-ジメトキシエタン (30mL) に溶解し、その溶液にシクロヘキシルメチルアミン (1.48 mL, 11.4 mmol) を加え、加熱還流下、1.5時間攪拌した。反応液を放冷した後、生じた結晶を濾取した。得られた粗結晶をエタノールから再結晶することにより、白

色結晶として4-[(2-ベンジルフェニル)(メチル)アミノ]-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸エチル(2.87 g, 6.27 mmol, 収率82%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 0.85-0.93 (m, 2 H), 1.03 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.09-1.24 (m, 3 H), 1.51-1.65 (m, 6 H), 3.05 (br s, 2 H), 3.07 (s, 3 H), 3.73 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.82 (s, 2 H), 6.97 (br s, 1 H), 7.03-7.28 (m, 9 H), 8.12 (s, 1 H)

工程3: 4-[(2-ベンジルフェニル)(メチル)アミノ]-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸の合成

工程2で得られた4-[(2-ベンジルフェニル)(メチル)アミノ]-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸エチル(0.5 g, 1.09 mmol)をエタノール(5 mL)に溶解し、その溶液に水酸化ナトリウム水溶液(1.0 mol/L, 10 mL, 10 mmol)を加え、加熱還流下、24時間攪拌した。反応液を半分の体積まで減圧濃縮し、塩酸(1.0 mol/L)で反応液のpH値を4.5に調整した。析出した結晶を濾取し、白色結晶として化合物38(474 mg, 1.09 mmol, 定量的収率)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 主なピークとして0.83-0.91 (m, 2 H), 1.12-1.25 (m, 3 H), 1.48-1.63 (m, 6 H), 3.04 (br s, 2 H), 3.18 (s, 3 H), 3.87 (s, 2 H), 7.00-7.41 (m, 10 H), 8.22 (s, 1 H)

APCI-MS: m/z 431 ($M + H$)⁺

IR(KBr): 2930, 2840, 2380, 2350, 1655, 1510, 1490, 1385, 1375 cm^{-1}

実施例5: 化合物39[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボヒドロキサム酸]の合成

工程1: 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸=ベンゾトリアゾール-1-イルの合成

実施例3で得られる化合物37(5.00 g, 12.0 mmol)をクロロホルム(50 mL)に溶解し、氷冷下、その溶液にN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(4.60 g, 24.0 mmol)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(3.30 g, 24.4 mmol)を加え、室温にて5時間攪拌した。さらに反応液にN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(2.30 g, 12.0 mmol)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(1.60 g, 12.0 mmol)を加え、室温にて2時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を5%クエン酸水溶液および飽和重曹水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去することにより、淡黄色結晶として4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸=ベンゾトリアゾール-1-イル(5.67 g, 10.6 mmol, 収率89%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.76-1.08 (m, 2 H), 1.09-1.33 (m, 3 H), 1.43-1.82 (m, 6 H), 3.14 (t, $J = 6.5$ Hz, 1.5 H), 3.35 (t, $J = 6.3$ Hz, 0.5 H), 3.92 (s, 0.5 H), 3.93 (s, 1.5 H), 5.47 (t, $J = 5.9$ Hz, 0.25 H), 5.89 (t, $J = 5.9$ Hz, 0.75 H), 6.99-7.30 (m, 9 H), 7.42-7.60 (m, 2 H), 7.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 0.25 H), 7.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 0.75 H), 8.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 8.95 (s, 0.75 H), 9.03 (br s, 0.25 H), 9.08 (s, 0.25 H), 9.19 (br s, 0.75 H)

工程2: [4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)]

ピリミジン-5-カルボヒドロキサム酸] の合成

工程1で得られた4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸=ベンゾトリアゾール-1-イル (1.40 g, 2.62 mmol) をテトラヒドロフラン (20 mL) と水 (20 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下、その溶液にヒドロキシルアミン塩酸塩 (546 mg, 7.88 mmol) および炭酸カリウム (1.27 g, 9.18 mmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を飽和重曹水にて洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。得られた油状物質を酢酸エチルから再結晶することにより、淡黄色結晶として化合物39 (490 mg, 1.14 mmol, 収率43%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6 , 80°C) δ (ppm): 0.76-0.99 (m, 2 H), 1.01-1.26 (m, 3 H), 1.45-1.74 (m, 6 H), 3.06 (br s, 2 H), 4.00 (s, 2 H), 6.99-7.26 (m, 9 H), 8.11 (dd, $J=1.2, 8.1\text{ Hz}$, 1 H), 8.33 (s, 1 H), 8.65 (br s, 1 H), 10.77 (br s, 1 H)

APCI-MS: m/z 432 ($M+H$) $^+$

実施例6: 化合物40 [4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボキサミド] の合成

実施例5の工程1で得られた4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸=ベンゾトリアゾール-1-イル (200 mg, 0.37 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (5 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液にアンモニア水 (28%, 5 mL) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を2-プロパノールから再結晶することにより、白色結晶として化合物40 (77 mg, 0.18 mmol, 収率50%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6 , 70°C) δ (ppm): 0.86-0.94 (m, 2 H), 1.12-1.25 (m, 3 H), 1.49-1.68 (m, 6 H), 3.12 (br t, $J=6.1\text{ Hz}$, 2 H), 3.99 (s, 2 H), 6.98-7.24 (m, 9 H), 7.28 (br s, 2 H), 8.17 (d, $J=8.1\text{ Hz}$, 1 H), 8.50 (s, 1H), 11.32 (br s, 1 H)

APCI-MS: m/z 416 ($M+H$) $^+$

実施例7: 化合物41 [4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-イル-N-(2-ヒドロキシエチル)カルボキサミド] の合成

実施例5の工程1で得られた4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸=ベンゾトリアゾール-1-イル (250 mg, 0.58 mmol) をアセトニトリル (5 mL) とN,N-ジメチルホルムアミド (2.5 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下、その溶液に2-アミノエタノール (71 μL , 1.46 mmol) および1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-ウンデク-7-エン (DBU) (217 μL , 1.46 mmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、5%クエン酸水溶液を加えて分液した後、有機層を飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を2-プロパノールから再結晶することにより、白色結晶として化合物41 (86 mg, 0.19 mmol, 収率32%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 主なピークとして 0.69-0.90 (m, 2 H), 0.96-1.26 (m, 3 H), 1.31-1.80 (m, 6 H), 3.00 (br s, 2 H), 3.54 (br s, 2 H), 3.81 (br s, 2 H), 4.00 (s, 2 H), 6.94-7.28 (m, 9 H), 7.77 (br s, 1 H), 8.16 (br s, 1 H), 8.65 (br s, 1 H), 11.48 (br s, 1 H)

APCI-MS: m/z 460 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

IR(KBr): 3125, 2890, 1734, 1716, 1695, 1668, 1662, 1655, 1601, 1581, 1558, 1551, 1527, 1497, 1473, 1454, 1431, 1417 cm^{-1}

実施例 8: 化合物 4 2 [2- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-イルカルボニルアミノ] 酢酸] の合成

工程 1: 2- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-イルカルボニルアミノ] 酢酸 = tert-ブチルの合成

実施例 5 の工程 1 で得られた 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 = ベンゾトリアゾール-1-イル (250 mg, 0.47 mmol) をアセトニトリル (2 mL) と N,N-ジメチルホルムアミド (2 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下、その溶液にグリシン tert-ブチル塩酸塩 (196 mg, 1.17 mmol) および DBU (350 μL , 2.34 mmol) を加え、室温にて 6 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、5% クエン酸水溶液を加えて分液した後、有機層を飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、淡黄色油状物質として 2- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-イルカルボニルアミノ] 酢酸 = tert-ブチル (246 mg, 0.46 mmol, 収率 99%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 0.74-0.99 (m, 2 H), 1.02-1.28 (m, 3 H), 1.42 (s, 9 H), 1.43-1.77 (m, 6 H), 3.05 (br s, 2 H), 3.85 (d, $J = 5.8$ Hz, 2 H), 3.97 (s, 2 H), 6.97-7.43 (m, 9 H), 8.09 (dd, $J = 1.2, 8.1$ Hz, 1 H), 8.43 (t, $J = 5.8$ Hz, 1 H), 8.51 (s, 1 H), 10.93 (br s, 1 H)

工程 2: 2- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-イルカルボニルアミノ] 酢酸の合成

工程 1 で得られた 2- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-イルカルボニルアミノ] 酢酸 = tert-ブチル (246 mg, 0.46 mmol) をジクロロメタン (3 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液にトリフルオロ酢酸 (5 mL) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をエタノール (3 mL) に溶解し、その溶液に水酸化ナトリウム水溶液 (1.0 mol/L, 1.84 mL, 1.84 mmol) を加え、室温にて 15 分間攪拌した。塩酸

(1.0 mol/L) で反応液の pH 値を 4.5 に調整し、水 (5 mL) を加え、析出した結晶を濾取した。得られた粗結晶を 2-プロパノールから再結晶することにより、白色結晶として化合物 4 2 (176 mg, 0.37 mmol, 収率 81%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.74-0.99 (m, 2 H), 1.00-1.32 (m, 3 H), 1.40-1.55 (m, 1 H), 1.56-1.90 (m, 5 H), 3.05 (d, $J = 6.3$ Hz, 2 H), 3.99 (s, 2 H), 4.05 (d, $J = 5.6$ Hz, 2 H), 7.02-7.23 (m, 9 H), 7.59 (d, $J = 6.3$ Hz, 1 H), 8.33 (br s, 1 H), 8.78 (s, 1 H), 8.84 (br s, 1 H), 11.53 (s, 1 H)

APCI-MS: m/z 474 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

IR(KBr): 3380, 3240, 3065, 2930, 2868, 1701, 1697, 1670, 1662, 1652, 1602,

1585, 1560, 1543, 1524, 1498, 1473, 1452, 1437, 1417, 1412 cm^{-1}

実施例9：化合物43 [2-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-イルカルボニル-N-メチルアミノ]酢酸]の合成
 工程1：2-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-イルカルボニル-N-メチルアミノ]酢酸エチルの合成

実施例5の工程1で得られた4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸=ベンゾトリアゾール-1-イル (1.0 g, 1.87 mmol) をアセトニトリル(10 mL)とN,N-ジメチルホルムアミド (10 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下、その溶液にN-メチルアミノ酢酸エチル塩酸塩 (430 mg, 2.81 mmol) およびDBU (840 μL , 5.62 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、5%クエン酸水溶液を加えて分液した後、有機層を飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、淡黄色油状物質として2-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-イルカルボニル-N-メチルアミノ]酢酸エチル (990 mg, 1.87 mmol, 定量的収率) を得た。

^1H NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 0.76-0.98 (m, 2 H), 1.01-1.27 (m, 3 H), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.42-1.77 (m, 6 H), 3.04 (br s, 2 H), 3.07 (s, 3 H), 3.93 (s, 2 H), 4.13 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 4.16 (s, 2 H), 6.97 (br s, 1 H), 7.01-7.24 (m, 8 H), 7.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 8.90 (br s, 1 H)

工程2：2-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-イルカルボニル-N-メチルアミノ]酢酸の合成

工程1で得られた2-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-イルカルボニル-N-メチルアミノ]酢酸エチル (990 mg, 1.87 mmol) をエタノール (20 mL) に溶解し、その溶液に水酸化ナトリウム水溶液 (1.0 mol/L, 4.0 mL, 4.0 mmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応液を半分の体積まで濃縮し、水 (20 mL) で希釈した。塩酸水溶液 (1.0 mol/L) で反応液のpH値を4.5に調整し、析出した結晶を濾取した。得られた粗結晶をエタノールから再結晶することにより、白色結晶として化合物43 (305 mg, 0.63 mmol, 収率34%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80°C) δ (ppm): 主なピークとして0.77-1.00 (m, 2 H), 1.04-1.32 (m, 3 H), 1.44-1.74 (m, 6 H), 3.07 (br s, 2 H), 3.08 (s, 3 H), 3.96 (s, 2 H), 4.12 (s, 2 H), 6.97 (br s, 1 H), 7.04-7.25 (m, 8 H), 7.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 8.02 (s, 1 H), 8.93 (br, 1 H)

APCI-MS: m/z 488 ($M + H$)⁺

IR(KBr): 2780, 1653, 1647, 1637, 1618, 1610, 1601, 1583, 1560, 1545, 1535, 1529, 1508, 1495, 1450, 1423, 1400 cm^{-1}

実施例10：化合物44 [4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-ヒドロキシメチルピリミジン]の合成

実施例5の工程1で得られた4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸=ベンゾトリアゾール-1-イル (2.00 g, 3.75 mmol) をテトラヒドロフラン (20 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気中、氷冷下、その溶液に水素化リチウムアルミニウム (0.28 g, 7.5 mmol) を加え、室温にて

1時間攪拌した。氷冷下、反応液に水 (0.30 mL)、水酸化ナトリウム水溶液 (4.0 mol/L, 0.30 mL) および水 (1.0 mL) を順次加え、室温にて15分間攪拌した。析出した固体を珪藻土を通して濾過し、クロロホルムで洗浄した。濾液および洗浄液を合わせ、水で希釈したのち、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、淡黄色結晶として化合物 4 4 (1.69 g, 0.76 mmol, 収率20%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 主なピークとして 0.74-1.01 (m, 2 H), 1.02-1.31 (m, 3 H), 1.45-1.81 (m, 6 H), 3.15 (t, $J = 6.3$ Hz, 2 H), 4.03 (s, 2 H), 4.27 (s, 2 H), 7.05-7.26 (m, 9 H), 7.41 (s, 1 H), 7.60 (s, 1 H), 8.10 (br s, 1 H)

APCI-MS: m/z 403 ($M + H$)⁺

IR(KBr): 3500, 2900, 2858, 1915, 1894, 1888, 1875, 1867, 1713, 1709, 1705, 1693, 1687, 1678, 1672, 1657, 1651, 1622, 1612 cm^{-1}

実施例 11: 化合物 4 5 [4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-(1-ヒドロキシエチル)ピリミジン] の合成

工程 1: 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-メチルチオピリミジンの合成

実施例 3 の工程 1 で得られた 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸エチル (5.0 g, 13.2 mmol) をテトラヒドロフラン

(50 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気中、氷冷下、その溶液に水素化リチウムアルミニウム (0.6 g, 15.8 mmol) を加え、室温にて3.5時間攪拌した。さらに、アルゴン雰囲気中、氷冷下、反応液に水素化リチウムアルミニウム (0.15 g, 4.0 mmol) を加え、室温にて1.5時間攪拌した。氷冷下、反応液に水 (0.8 mL)、水酸化ナトリウム水溶液 (4 mol/L, 0.8 mL) および水 (2.4 mL) を順次加え、室温にて15分間攪拌した。析出した固体を珪藻土を通して濾過し、クロロホルムで洗浄した。濾液および洗浄液を合わせ、水で希釈した後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、淡黄色油状物質として 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-メチルチオピリミジン (3.70 g, 11.0 mmol, 収率83%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 主なピークとして 2.40 (s, 3 H), 4.03 (s, 2 H), 4.34 (s, 2 H), 7.10-7.32 (m, 8 H), 7.66 (s, 1 H), 7.68 (s, 1 H), 8.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H)

工程 2: 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-ホルミル-2-メチルチオピリミジンの合成

工程 1 で得られた 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-メチルチオピリミジン (3.70 mg, 11.0 mmol) をクロロホルム (100 mL) に溶解し、その溶液に二酸化マンガンを加え、室温にて18時間攪拌した。反応液を珪藻土を通して濾過し、濾別した固体をクロロホルムで洗浄した。濾液および洗浄液を合わせて減圧濃縮し、得られた残渣をエタノールから再結晶することにより、淡黄色結晶として 4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-ホルミル-2-メチルチオピリミジン (1.94 g, 5.78 mmol, 収率53%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.41 (s, 3 H), 4.05 (s, 2 H), 7.08-7.28 (m,

8 H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 8.37 (s, 1 H), 9.72 (s, 1 H), 10.28 (br s, 1 H)

工程 3 : 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5- (1-ヒドロキシエチル) -2-メチルチオピリミジンの合成

アルゴン雰囲気下、工程 2 で得られた 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5-ホルミル-2-メチルチオピリミジン (500 mg, 1.49 mmol) をテトラヒドロフラン

(10 mL) に溶解し、その溶液に 20℃ にて臭化メチルマグネシウム (0.93 mol/L テトラヒドロフラン溶液, 4.0 mL, 3.7 mmol) を加え、-20℃ にて 1.5 時間攪拌した。反応液に -20℃ にて飽和塩化アンモニウム水溶液を徐々に加えた。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、淡黄色油状物質として 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5- (1-ヒドロキシエチル) -2-メチルチオピリミジン (560 mg, 1.49 mmol, 定量的収率) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 主なピークとして 1.33 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 2.37 (s, 3 H), 4.02 (s, 2 H), 4.60 (q, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 7.07-7.29 (m, 8 H), 7.60 (s, 1 H), 8.01 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 8.25 (s, 1 H)

工程 4 : 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -5- (1-ヒドロキシエチル) ピリミジンの合成

工程 3 で得られた 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5- (1-ヒドロキシエチル) -2-メチルチオピリミジン (73.4 mg, 0.24 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液にメタクロ濾過安息香酸 (50 mg, 0.29 mmol) を加え、室温にて 30 分間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水を加えて分液した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をジオキサン (3 mL) に溶解し、その溶液に N,N -ジイソプロピルエチルアミン (0.080 mL, 0.48 mmol) およびシクロヘキシルメチルアミン

(0.060 mL, 0.48 mmol) を加え、加熱還流下、4 日間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、淡黄色油状物質として

化合物 4 5 (86.1 mg, 0.207 mmol, 収率 86%) を得た。

^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 主なピークとして 0.68-1.03 (m, 2 H), 1.04-1.37 (m, 3 H), 1.45-1.88 (m, 6 H), 2.25 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 3.18 (dd, $J = 4.5, 6.4$ Hz, 2 H), 3.58 (q, $J = 6.6$ Hz, 1 H), 4.06 (s, 2 H), 6.97-7.28 (m, 9 H), 7.61 (s, 1 H), 8.23 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 9.93 (br s, 1 H)

APCI-MS : m/z 399 ($\text{M} - \text{OH}$) $^+$

実施例 12 : 化合物 4 6 [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -5- (1-ヒドロキシ-1-メチルエチル) ピリミジン] の合成

工程 1 : 5-アセチル-4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2-メチルチオピリミジンの合成

実施例 11 の工程 3 で得られた 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5- (1-ヒドロキシエチル) -2-メチルチオピリミジン (524 mg, 1.49 mmol) をクロロホルム

(10 mL) に溶解し、その溶液に二酸化マンガン (1.3 g, 15 mmol) を加え、室温にて 12 時間攪拌した。さらにその溶液にクロロホルム (10 mL) および二酸化マ

ンガン (1.3 g, 15 mmol) を加え、加熱還流下、2時間攪拌した。反応液を珪藻土を通して濾過し、濾別した固体をクロロホルムで洗浄した。濾液および洗浄液を合わせて減圧濃縮することにより淡黄色結晶として5-アセチル-4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2-メチルチオピリミジン (381 mg, 1.09 mmol, 収率73%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.37 (s, 3 H), 2.54 (s, 3 H), 4.03 (s, 2 H), 7.08-7.29 (m, 8 H), 7.80 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 8.63 (s, 1 H), 10.94 (br s, 1 H)

工程2 : 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5- (1-ヒドロキシ-1-メチルエチル) -2-メチルチオピリミジンの合成

アルゴン雰囲気下、工程1で得られた5-アセチル-4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2-メチルチオピリミジン (272 mg, 0.78 mmol) をテトラヒドロフラン

(5 mL) に溶解し、その溶液に-20℃にて臭化メチルマグネシウム (0.93 mol/L テトラヒドロフラン溶液, 2.5 mL, 2.3 mmol) を加え、-20℃にて1時間、0℃にて

1時間攪拌した。さらに、反応液に0℃にて臭化メチルマグネシウム (0.93 mol/L テトラヒドロフラン溶液, 2.5 mL, 2.3 mmol) を加え、室温にて2.5時間攪拌した。

反応液に0℃にて飽和塩化アンモニウム水溶液を徐々に加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、淡黄色油状物質として4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5- (1-ヒドロキシ-1-メチルエチル) -2-メチルチオピリミジン (264 mg, 0.72 mmol, 収率93%) を得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 主なピークとして1.46 (s, 6 H), 2.37 (s, 3 H), 4.01 (s, 2 H), 7.01-7.29 (m, 8 H), 7.78 (s, 1 H), 7.94 (d, J = 7.7 Hz, 1 H), 8.84 (br s, 1 H)

工程3 : 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -5- (1-ヒドロキシ-1-メチルエチル) ピリミジンの合成

工程2で得られる4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -5- (1-ヒドロキシ-1-メチルエチル) -2-メチルチオピリミジン (284 mg, 0.78 mmol) をジクロロメタン

(5 mL) に溶解し、氷冷下、その溶液にメタクロ濾過安息香酸 (200 mg,

1.17 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。さらに氷冷下、反応液にメタクロ濾過安息香酸 (133 mg, 0.78 mmol) を加え、室温にて30分間攪拌した。反応液を

ジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水を加えて分液した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をジオキサソ

(3 mL) に溶解し、その溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.30 mL, 2.3 mmol) およびシクロヘキシルメチルアミン (0.22 mL, 2.3 mmol) を加え、加

熱還流下、4日間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水を加えて分液した後、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した

後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、油状物質を得た。得られた油状物質をジエチルエーテルから再結晶することにより、淡黄色結晶として化合物46 (80.5 mg, 0.18 mmol,

収率24%) を得た。

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.76-1.02 (m, 2 H), 1.10-1.35 (m, 3 H), 1.43-1.80 (m, 6 H), 2.47 (s, 6 H), 3.15 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 4.03 (s, 1 H), 4.07 (s, 2

H), 5.55 (br s, 1H), 7.11-7.25 (m, 9H), 8.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.58 (s, 1H)
 APCI-MS : m/z 415 ($M - CH_3$)⁺

IR(KBr) : 3260, 2800, 2600, 1994, 1969, 1951, 1944, 1932, 1925, 1624, 1578,
 1545, 1524, 1498, 1473, 1466, 1454, 1439, 1423 cm^{-1}

実施例 13 : 化合物 47 [N- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボニル] -4-トルエンスルホンアミド] の合成

参考例 10 で得られた ベンゾトリアゾール-1-イル-4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラート (0.20 g, 0.37 mmol) をアセトニトリル (4 mL) および N,N-ジメチルホルムアミド (2 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下、4-トルエンスルホンアミド (0.10 g, 0.56 mmol) および DBU (80 μ L, 0.56 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。さらに 4-トルエンスルホンアミド (60 mg, 0.37 mmol) および DBU (50 μ L, 0.37 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、5%クエン酸水溶液、飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。得られた粗結晶を 2-プロパノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (97 mg, 0.17 mmol, 収率 46%) を得た。

¹H-NMR (270 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 0.70-0.90 (m, 2H), 0.95-1.24 (m, 3H), 1.30-1.75 (m, 6H), 2.34 (s, 3H), 3.07 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.94 (s, 2H), 7.05-7.22 (m, 11H), 7.66 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.08 (br s, 1H), 8.51 (s, 1H), 12.45 (s, 1H)

APCI-MS : m/z 568 ($M-H$)⁺

IR(KBr) : 2875, 2850, 1656, 1648, 1641, 1601, 1583, 1558, 1541, 1516, 1512, 1508, 1488, 1452, 1402, 1371 cm^{-1}

実施例 14 : 化合物 48 [N- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボニル] メタンスルホンアミド] の合成

参考例 10 で得られたベンゾトリアゾール-1-イル 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラート

(0.20 g, 0.37 mmol) をアセトニトリル (4 mL) および N,N-ジメチルホルムアミド (2 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下、メタンスルホンアミド (50 mg, 0.56 mmol) および DBU (80 μ L, 0.56 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。さらにメタンスルホンアミド (30 mg, 0.37 mmol) および DBU (50 μ L, 0.37 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、5%クエン酸水溶液、飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。得られた粗結晶を 2-プロパノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (39 mg, 0.080 mmol, 収率 22%) を得た。

¹H-NMR (270 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 0.74-0.95 (m, 2H), 0.99-1.30 (m, 3H), 1.40-1.80 (m, 6H), 2.94 (s, 3H), 3.07 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 7.13 (m, 9H), 7.63 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.00 (br s, 1H), 8.59 (s, 1H), 12.33 (s, 1H)

APCI-MS : m/z 492 ($M-H$)⁺

IR(KBr) : 2920, 2850, 1655, 1637, 1608, 1587, 1578, 1560, 1545, 1541, 1535, 1522, 1454, 1402, 1323, 1277 cm^{-1}

実施例 15 : 化合物 49 [N- [4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボニル] トリフルオロメタンスルホンアミド] の合成

参考例 10 で得られたベンゾトリアゾール-1-イル 4- (2-ベンジルフェニルアミノ) -2- (シクロヘキシルメチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラート

(0.30 g, 0.70 mmol) をアセトニトリル (6 mL) および N,N-ジメチルホルムアミド (6 mL) の混合溶媒に溶解し、氷冷下、トリフルオロメタンスルホンアミド (259 mg, 1.74 mmol) および DBU (260 μL , 1.74 mmol) を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、5%クエン酸水溶液、飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を 2-プロパノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (0.25 g, 0.46 mmol, 収率 65%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) : 0.64-0.93 (m, 2H), 0.99-1.23 (m, 3H), 1.29-1.78 (m, 6H), 2.97 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 7.05-7.34 (m, 9H), 7.73 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 8.24 (br, 1H), 8.26 (s, 1H), 11.88 (s, 1H)

APCI-MS : m/z 548 ($M+H$) $^+$

IR(KBr) : 1757, 1749, 1732, 1716, 1653, 1641, 1583, 1556, 1510, 1493, 1331, 1315, 1194 cm^{-1}

実施例 16 : 化合物 50 ~ 234 の合成

工程 1

市販のエチル 4-クロロ-2-メチルチオ-5-ピリミジンカルボキシラートの 1.75g/30mL テトラヒドロフラン (THF) 溶液 300 μL (17.5 mg, 75.2 μmol) に、各種アミン試薬 (100 μmol) およびモリホリノメチルポリスチレン (42.0 mg, 147 μmol) を加え、60°C で一晩攪拌した。THF (0.3 mL) とベンゾイルクロリドポリマーバウンド (45.0 mg, 90 μmol) を加えてさらに一晩攪拌した後、不溶物を濾過、洗浄し、得られた濾液と洗浄液を合わせて濃縮し、残渣を得た。

工程 2

工程 1 で得られた残渣をジクロロメタン (0.3 mL) に溶解し、m-クロ濾過安息香酸 (含量 65%, 26.5 mg, 100 μmol) を加えて 1 時間攪拌した。反応液をジクロロメタン (0.1 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。得られた残渣を THF (0.2 mL) に溶解し、各種アミン (100 μmol) を加え、60°C で一晩攪拌した。クロロホルム (0.4 mL)、モリホリノメチルポリスチレン (42.0 mg, 147 μmol) およびベンゾイルクロリドポリマーバウンド (90.0 mg, 180 μmol) を加えてさらに一晩攪拌した後、不溶物を濾過、洗浄し、得られた濾液と洗浄液を合わせて濃縮し、残渣を得た。

工程 3

工程 2 で得られた残渣をエタノール (0.3 mL) および THF (0.05 mL) の混合溶媒に溶解し、1mol/L NaOH 水溶液 (145 μL) を加えて 65°C で一晩攪拌した。メタノール (0.4 mL) および 1 mol/L HCl 水溶液 (145 μL) を加えて攪拌した後、溶媒を留去し、得られた残渣にクロロホルム (0.3 mL)、メタノール (0.1 mL)

およびヘキサフルオロイソプロピルアルコール(0.2 mL)を加えてよく攪拌した。不溶物を濾別し、得られた濾液を濃縮することにより目的化合物50~234を得た。

以下に、実施例16で得られた代表的化合物の収率、¹H NMR スペクトルデータおよびマススペクトルデータを示す。

2- (3-クロロベンジルアミノ) -4- (2-フェニルプロピルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物64)

収率: 56% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 80°C) δ (ppm): 1.18 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 2.99 (m, 1H), 3.55 (m, 2H), 4.59 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 7.14-7.35 (m, 9H), 7.72 (br s, 1H), 8.19 (br t, 1H), 8.37 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 397 (M+H)⁺

4- (2-フェニルプロピルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物71)

収率: 56% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 80°C) δ (ppm): 1.16 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 2.98 (m, 1H), 3.54 (m, 2H), 4.59 (d, J = 6.4 Hz, 0.4H), 4.66 (d, J = 6.2 Hz, 1.6H), 6.95-7.79 (m, 9H), 8.00 (br s, 0.2H), 8.17 (br s, 0.8H), 8.38 (s, 0.2H), 8.59 (s, 0.8H), 10.90 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 431 (M+H)⁺

2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -4- (1-メチル-2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物106)

収率: 46% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 80°C) δ (ppm): 0.92-1.09 (m, 2H), 1.13-1.27 (m, 3H), 1.43 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.58-1.80 (m, 6H), 3.26 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.96 (dd, J = 6.0, 9.1 Hz, 1H), 4.14 (dd, J = 4.6, 9.1 Hz, 1H), 4.61 (m, 1H), 6.93 (m, 3H), 7.23 (m, 2H), 8.37 (s, 1H), 9.77 (br s, 1H), 10.3 (br d, J = 5.9 Hz, 1H)

ESI-MS: m/z 385 (M+H)⁺

4- (1-メチル-2-フェノキシエチルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物112)

収率: 65% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 80°C) δ (ppm): 1.29 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 3.86 (dd, J = 5.3, 9.0 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 4.4, 9.0 Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 4.55 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.88 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.30 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 10.16 (br s, 1H), 10.47 (br t, 1H)

ESI-MS: m/z 447 (M+H)⁺

2- (ベンジルブチルアミノ) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物117)

収率: 74% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 80°C) δ (ppm): 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.31 (sextet, J = 7.3 Hz, 2H), 1.60 (quintet, J = 7.3 Hz, 2H), 3.61 (br s, 2H), 3.82 (br s, 2H), 4.04 (br s, 2H), 4.89 (s, 2H), 6.83-6.93 (m, 3H), 7.19-7.29 (m, 7H), 8.16 (br s,

1H), 8.69 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 421 (M+H)⁺

2- (オクタヒドロイソキノリン-2-イル) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 2 1)

収率 : 39% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 80°C) δ (ppm) : 1.27-1.94 (m, 12H), 3.28-3.42 (m, 2H), 3.87 (q, J = 5.8 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.26-4.42 (m, 2H), 6.90-6.95 (m, 3H), 7.24 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 8.14 (br s, 1H), 8.63 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 397 (M+H)⁺

4- (2-フェノキシエチルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 2 3)

収率 : 60% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 80°C) δ (ppm) : 3.75 (q, J = 5.7 Hz, 2H), 4.04 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 4.57 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 6.92 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.25 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.47-7.63 (m, 4H), 7.78 (br s, 1H), 8.39 (br s, 1H), 8.40 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 433 (M+H)⁺

4- (2-フェノキシフェニルアミノ) -2- [(ピリジン-2-イルメチル) アミノ] ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 3 8)

収率 : 50% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 80°C) δ (ppm) : 4.66 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 6.94-7.10 (m, 6H), 7.20-7.35 (m, 4H), 7.71 (dt, J = 1.8, 7.5 Hz, 1H), 8.02 (br s, 1H), 8.54 (t, J = 4.2 Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 10.88 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 414 (M+H)⁺

2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -4- (2-フェノキシフェニルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 3 9)

収率 : 70% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 80°C) δ (ppm) : 0.92-1.09 (m, 2H), 1.13-1.27 (m, 3H), 1.62-1.77 (m, 6H), 3.21 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 6.95-7.18 (m, 6H), 7.29-7.36 (m, 2H), 7.53 (br s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.73 (br s, 1H), 10.87 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 419 (M+H)⁺

2- (2-メチルベンジルアミノ) -4- (2-フェノキシフェニルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 4 2)

収率 : 70% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 80°C) δ (ppm) : 2.32 (s, 3H), 4.55 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 6.94-7.34 (m, 13H), 7.92 (br s, 1H), 8.56 (s, 1H), 10.84 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 427 (M+H)⁺

2- (ベンジルブチルアミノ) -4- (2-フェノキシフェニルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 4 3)

収率 : 20% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 80°C) δ (ppm) : 0.92 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.35 (sextet, J = 7.3 Hz, 2H), 1.65 (quintet, J = 7.3 Hz, 2H), 3.65 (br s, 2H), 4.94 (s, 2H), 6.96-7.04 (m, 6H), 7.20-7.32 (m, 8H), 8.77 (s, 1H), 10.4 (br s, 1H)

ESI-MS : m/z 469 (M+H)⁺

4- (2-フェノキシフェニルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)
ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 4 8)

収率 : 63% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 80°C) δ (ppm) : 4.64 (d, J = 6.2 Hz, 2H),
6.93-7.09 (m, 7H), 7.29 (dd, J = 7.5, 8.4 Hz, 2H), 7.51-7.67 (m, 4H), 8.13 (br s,
1H), 8.56 (s, 1H), 10.83 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 481 (M+H)⁺

4- (4-フェニルピペリジン-1-イル) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)
ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 1 7 7)

収率 : 72% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 80°C) δ (ppm) : 1.56 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 2.77
(tt, J = 3.8, 11.9 Hz, 1H), 3.00 (dt, J = 2.3, 14.4 Hz, 2H), 4.09 (d, J = 13.2 Hz,
2H), 4.56 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 7.14-7.30 (m, 5H), 7.48-7.66 (m, 5H), 8.37 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 457 (M+H)⁺

実施例 1 7 : 化合物 2 3 5 ~ 3 9 3 の合成

工程 1

市販のエチル 4-クロロ-2-メチルチオ-5-ピリミジンカルボキシラートの
1.54g/22mL THF 溶液 200 μL (14.0 mg, 60.2 μmol) に、各種アミン試薬
(90 μmol) およびモリホリノメチルポリスチレン (42.0 mg, 147 μmol) を加
え、60°Cで一晩攪拌した。THF (0.3 mL) とベンゾイルクロリドポリマーバウン
ド (45.0 mg, 90 μmol) を加え、さらに一晩攪拌した後、不溶物を濾過、洗浄し、
得られた濾液と洗浄液を合わせて濃縮し、残渣を得た。

工程 2

工程 1 で得られた残渣をジクロロメタン (0.2 mL) に溶解し、m-クロ濾過安息
香酸 (含量 65%, 23.9 mg, 90.0 μmol) を加えて室温で 1 時間攪拌した。反応液
をジクロロメタン (0.1 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄し、有機層を無水硫酸
マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。得られた残渣を THF (0.2 mL) に
溶解し、各種アミン (90 μmol) を加え、60°Cで一晩攪拌した。クロロホルム
(0.4 mL)、モルホリノメチルポリスチレン (42.0 mg, 147 μmol) およびベンゾ
イルクロリドポリマーバウンド (90.0 mg, 180 μmol) を加えてさらに一晩攪拌
した後、不溶物を濾過、洗浄し、得られた濾液と洗浄液を合わせて濃縮し、残渣
を得た。

工程 3

工程 2 で得られた残渣をトルエン (0.5 mL) に溶解し、65 重量%水素化ビス (2-
メトキシエトキシ) アルミニウム トルエン溶液 (62.4 μL, 208 μmol) を加え、
0°Cで 4 時間攪拌した。3 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (300 μL) を 2 回に分
けて加えた後、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウム
で乾燥した後、溶媒を留去することにより目的化合物 2 3 5 ~ 3 9 3 を得た。

以下に、実施例 1 7 で得られた代表的化合物の収率、¹H NMR スペクトルデー
タおよびマススペクトルデータを示す。

2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-4- (1-メチル-2-フェノキ

シエチルアミノ) ピリミジン (化合物 2 5 6)

収率: 38% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.89-1.10 (m, 2H), 1.15-1.24 (m, 3H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.47-1.78 (m, 6H), 3.21 (dt, J = 2.6, 6.6 Hz, 2H), 3.96 (dd, J = 5.6, 9.1 Hz, 1H), 4.10 (dd, J = 3.8, 9.1 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.46-4.63 (m, 1H), 4.86 (br t, 1H), 5.68 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 6.94 (t, J = 8.6 Hz, 3H), 7.23-7.30 (m, 2H), 7.59 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 371 (M+H)⁺

2- (ベンジルブチルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン (化合物 2 6 4)

収率: 55% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.31 (sextet, J = 7.1 Hz, 2H), 1.59 (m, 2H), 3.55 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.78 (br s, 2H), 3.98 (br s, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.84 (s, 2H), 5.86 (br s, 1H), 6.81 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.93 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.18-7.30 (m, 7H), 7.71 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 407 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-2- (オクタヒドロイソキノリン-2-イル) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン (化合物 2 6 7)

収率: 44% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.25-1.91 (m, 12H), 3.27 (m, 2H), 3.89 (m, 2H), 4.16 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.42 (s, 2H), 5.85 (br t, J = 5.1 Hz, 1H), 6.89-6.97 (m, 3H), 7.23-7.30 (m, 2H), 7.65 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 383 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-4- (4-フェニルブチルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン (化合物 2 7 8)

収率: 60% (4 工程)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.57-1.68 (m, 4H), 2.60 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.38 (q, J = 6.3 Hz, 2H), 4.40 (s, 2H), 4.60 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 5.36 (br s, 1H), 5.65 (br t, 1H), 7.12-7.29 (m, 5H), 7.39 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.60 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 431 (M+H)⁺

2- (3-フルオロベンジルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-4- (インダン-2-イルアミノ) ピリミジン (化合物 2 8 7)

収率: 69% (4 工程)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.20 (br s, 1H), 2.79 (dd, J = 6.3, 16.0 Hz, 2H), 3.27 (dd, J = 7.4, 16.0 Hz, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.57 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.79 (m, 1H), 5.35 (br s, 1H), 5.85 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.92 (dt, J = 2.1, 8.4 Hz, 1H), 7.07 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.13-7.29 (m, 5H), 7.51 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 365 (M+H)⁺

4- (2,3-ジヒドロベンゾ [1,4] ジオキシシ-6-イルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン (化合物 2 9 9)

収率: 59% (4 工程)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.23 (s, 4H), 4.50 (s, 2H), 4.61 (d, J = 6.3

Hz, 2H), 5.46 (br s, 1H), 6.72 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.81 (dd, J = 2.5, 8.7 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.39 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.48 (br d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.62 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 433 (M+H)⁺

2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェノキシフェニルアミノ) ピリミジン (化合物 3 2 0)

収率 : 27% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.91-1.03 (m, 2H), 1.13-1.31 (m, 3H), 1.65-1.83 (m, 6H), 3.25 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 4.40 (s, 1H), 5.06 (br s, 1H), 6.96-7.22 (m, 6H), 7.27-7.32 (m, 3H), 7.71 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.62 (d, J = 6.2, 1H)

ESI-MS : m/z 405 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-2- (2-メチルベンジルアミノ) -4- (2-フェノキシフェニルアミノ) ピリミジン (化合物 3 2 1)

収率 : 33% (4 工程)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 2.36 (s, 3H), 4.42 (s, 2H), 4.58 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 5.23 (br s, 1H), 6.93-7.08 (m, 6H), 7.12-7.32 (m, 7H), 7.70 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.40 (d, J = 7.6 Hz, 1H)

ESI-MS : m/z 413 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェノキシエチルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン (化合物 3 8 6)

収率 : 48% (4 工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.78 (q, J = 5.3 Hz, 2H), 4.00 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.62 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 5.32 (br t, 1H), 6.05 (br t, 1H), 6.83 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.93 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.24-7.29 (m, 2H), 7.39 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.59 (s, 2H)

ESI-MS : m/z 419 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェノキシフェニルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン (化合物 3 8 7)

収率 : 27% (4 工程)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 4.41 (s, 2H), 4.65 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 5.50 (br s, 1H), 6.92-7.07 (m, 6H), 7.23-7.66 (m, 2H), 7.39-7.66 (m, 5H), 8.31 (br d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 467 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェノキシフェニルアミノ) -2- [(ピリジン-2-イルメチル) アミノ] ピリミジン (化合物 3 8 8)

収率 : 25% (4 工程)

¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 4.26 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 4.56 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 5.32 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 6.93-7.47 (m, 12H), 7.71 (dt, J = 1.8, 7.7 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.52 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 400 (M+H)⁺

2- (ベンジルブチルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェノキシフェニルアミノ) ピリミジン (化合物 3 8 9)

収率 : 31% (4 工程)

¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.92 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.35 (sextet, J = 7.2 Hz, 2H), 1.60-1.69 (m, 2H), 3.58 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 4.39 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 6.93-7.07 (m, 6H), 7.18-7.32 (m, 8H), 7.77 (s, 1H), 8.28 (br s, 1H)

ESI-MS: m/z 455 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-4- (1-メチル-2-フェノキシエチルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン (化合物 390)

収率: 46% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.32 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 3.86 (dd, J = 5.1, 9.1 Hz, 1H), 3.95 (dd, J = 3.8, 9.1 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.46-4.53 (m, 1H), 4.60 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 5.30 (br s, 1H), 5.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.87 (dd, J = 1.1, 7.7 Hz, 2H), 6.93 (tt, J = 1.1, 7.3 Hz, 1H), 7.21-7.28 (m, 2H), 7.38 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (br s, 1H), 7.61 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 433 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェニルプロピルアミノ) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン (化合物 391)

収率: 48% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.24 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 2.98 (sextet, J = 7.0 Hz, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 4.30 (s, 2H), 4.65 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 5.28 (br s, 1H), 5.55 (br s, 1H), 7.11-7.30 (m, 5H), 7.41 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.61 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 417 (M+H)⁺

2- (3-クロロベンジルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェニルプロピルアミノ) ピリミジン (化合物 392)

収率: 41% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.26 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 2.98 (sextet, J = 7.3 Hz, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 4.31 (s, 2H), 4.58 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 5.23 (br s, 1H), 5.54 (br s, 1H), 7.12-7.35 (m, 9H), 7.55 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 383 (M+H)⁺

5-ヒドロキシメチル-4- (4-フェニルピペリジン-1-イル) -2- (3-トリフルオロメチルベンジルアミノ) ピリミジン (化合物 393)

収率: 64% (4工程)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.73 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 2.75 (tt, J = 4.0, 12.1 Hz, 1H), 2.96 (dt, J = 2.6, 13.2 Hz, 2H), 4.39 (br d, J = 13.2 Hz, 2H), 4.51 (s, 2H), 4.64 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 5.34 (br s, 1H), 7.18-7.33 (m, 5H), 7.41 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.88 (s, 1H)

ESI-MS: m/z 443 (M+H)⁺

実施例 18: 2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 116) の合成

工程 1: エチル 2-メチルチオ-4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラートの合成

市販のエチル 4-クロロ-2-メチルチオ-5-ピリミジincarボキシレート (11.3 g,

48.6 mmol) をテトラヒドロフラン (300 mL) に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (16.9 mL, 97.0 mmol) および 2-フェノキシエチルアミン (9.54 mL, 72.9 mmol) を加え、室温で 5 時間攪拌した。反応液を減圧留去し、酢酸エチルで希釈した。有機層を水および飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をエタノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (16.1 g, 48.3 mmol, 定量的収率) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.35 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 2.52 (s, 3H), 3.96 (q, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H), 4.16 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H), 4.33 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 6.91-6.98 (m, 3H), 7.26 (t, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 8.54 (br s, 1H), 8.63 (s, 1H)

工程 2: エチル 2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラートの合成

工程 1 で得られたエチル 2-メチルチオ-4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラート (10.0 g, 30.2 mmol) をジクロロメタン (200 mL) に溶解し、氷冷下 m-クロ濾過安息香酸 (含量 65%, 12.0 g, 45.2 mmol) を 10 分間かけて加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をテトラヒドロフラン (200 mL) に溶解し、シクロヘキシルメチルアミン (5.89 mL, 45.2 mmol) を加え、加熱還流下 10 時間攪拌した。反応液を減圧留去し、得られた粗結晶をエタノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (9.74 g, 24.4 mmol, 収率 81%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , 80°C) δ (ppm): 0.93-1.06 (m, 2H), 1.11-1.27 (m, 3H), 1.32 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 1.51-1.78 (m, 6H), 3.28 (t, $J = 6.6\text{Hz}$, 2H), 3.87 (q, $J = 5.7\text{Hz}$, 2H), 4.15 (t, $J = 5.7\text{Hz}$, 2H), 4.29 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 5.22 (br s, 1H), 6.89-6.95 (m, 3H), 7.21-7.28 (m, 2H), 8.34 (br s, 1H), 8.55 (s, 1H)

工程 3: 2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボン酸 (化合物 116) の合成

工程 2 で得られたエチル 2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラート (1.00 g, 2.51 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解し、3 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (10.0 mL, 30.0 mmol) を加え、 50°C で 5 時間攪拌した。反応液を半分の体積まで減圧濃縮し、1 mol/L 塩酸水溶液で反応液の pH を 4.5 に調整した。析出した結晶を濾取することにより白色結晶として標記化合物 (880 mg, 2.25 mmol, 収率 95%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.90-1.01 (m, 2H), 1.08-1.25 (m, 3H), 1.59-1.80 (m, 6H), 3.26 (t, $J = 5.9\text{Hz}$, 2H), 3.93 (q, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H), 4.18 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H), 6.91-6.98 (m, 3H), 7.25-7.31 (m, 2H), 8.36 (s, 1H), 9.89 (br s, 1H), 10.37 (br s, 1H)

ESI-MS: m/z 371 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

実施例 19: 2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -5-ヒドロキシメチル-4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン (化合物 263) の合成

実施例 18 の工程 2 で得られたエチル 2- (シクロヘキシルメチルアミノ) -4- (2-フェノキシエチルアミノ) ピリミジン-5-カルボキシラート (1.00 g, 2.51 mmol) をトルエン (20 mL) に溶解し、フラスコ内をアルゴンガスで置換後、

0℃で 65 重量%水素化ピス (2-メトキシエトキシ) アルミニウム トルエン溶液 (3.00 mL, 9.99 mmol) を加え、0℃で 2 時間攪拌した。3 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をエタノールから再結晶することにより白色結晶として標記化合物 (500 mg, 1.40 mmol, 収率 56%) を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 0.93-1.00 (m, 2H), 1.16-1.24 (m, 3H), 1.51-1.79 (m, 6H), 3.20 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.84 (q, J = 5.5 Hz, 2H), 4.14 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 4.39 (s, 2H), 4.87 (br t, J = 5.5 Hz, 1H), 6.01 (br t, J = 5.7 Hz, 1H), 6.89-6.97 (m, 3H), 7.24-7.30 (m, 2H), 7.49 (s, 1H)

ESI-MS : m/z 357 (M+H)⁺

製剤例 1 : 錠剤

常法により、次の組成からなる錠剤を調製する。

処方 化合物 1	20 mg
乳糖	143.4 mg
馬鈴薯デンプン	30 mg
ヒドロキシプロピルセルロース	6 mg
ステアリン酸マグネシウム	0.6 mg
	200 mg

製剤例 2 : 注射剤

常法により、次の組成からなる注射剤を調製する。

処方 化合物 3 7	2 mg
精製ダイズ油	200 mg
精製卵黄レシチン	24 mg
注射用グリセリン	50 mg
注射用蒸留水	1.72 mL
	2.00 mL

産業上の利用可能性

本発明により、1) GPR88の機能抑制作用を有する物質、GPR88のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩等を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤、2) GPR88のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩等を有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤、3) 中枢疾患の予防および/または治療作用を有する化合物のスクリーニング方法、4) GPR88の機能抑制作用を有するピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩、5) GPR88の機能抑制作用を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド等が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号7-Strg-AS1、GPR88遺伝子に対するフォスフォロチオエート・アンチセンスオリゴヌクレオチド

配列番号8-ポリアデニル化シグナルを含む二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号9-ポリアデニル化シグナルを含む二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号10-ポリアデニル化シグナルを含む二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号11-ポリアデニル化シグナルを含む二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号12-2つのCRE配列を含む二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号13-2つのCRE配列を含む二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号14- $G\alpha_{s4}$ 遺伝子特異的PCRプライマー

配列番号15- $G\alpha_{s4}$ 遺伝子特異的PCRプライマー

配列番号16- $G\alpha_q$ のC末5アミノ酸残基をコードする二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号17- $G\alpha_q$ のC末5アミノ酸残基をコードする二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号18- $G\alpha_i$ のC末5アミノ酸残基をコードする二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号19- $G\alpha_i$ のC末5アミノ酸残基をコードする二本鎖DNA構築用合成DNA

配列番号20-V2遺伝子特異的PCRプライマー

配列番号21-V2遺伝子特異的PCRプライマー

配列番号22-GPR12遺伝子特異的PCRプライマー

配列番号23-GPR12遺伝子特異的PCRプライマー

配列番号24-pAGal9-nd特異的塩基配列決定用プライマー

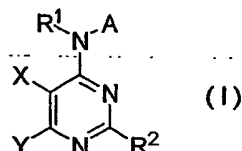
配列番号25-pAGal9-nd特異的塩基配列決定用プライマー

配列番号26-GPR88遺伝子特異的PCRプライマー

配列番号27-GPR88遺伝子特異的PCRプライマー

請 求 の 範 囲

1. G蛋白質共役型レセプター蛋白質88 (GPR88 ; G-Protein coupled receptor 88) の機能抑制作用を有する物質を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。
2. 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である請求の範囲第1項記載の予防および/または治療剤。
3. (a)試験化合物をGPR88発現細胞に接触させ、細胞応答を測定する工程と、(b)該試験化合物を添加しない場合のGPR88発現細胞の細胞応答と比較して、試験化合物を接触させた場合の細胞応答が低下することを確認する工程とを含む中枢疾患の予防および/または治療作用を有する化合物のスクリーニング方法。
4. 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である請求の範囲第3項記載の方法。
5. GPR88の機能抑制作用を有する物質が配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである請求の範囲第1項記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。
6. GPR88の機能抑制作用を有する物質が、GPR88に対する抗体である請求の範囲第1項記載の中枢疾患の予防および/または治療剤。
7. 請求の範囲第3項記載のスクリーニング方法によって確認されたGPR88の細胞応答を低下させる化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。
8. 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である請求の範囲第5～7項のいずれかに記載の予防および/または治療剤。
9. 配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。
10. 配列番号8で表される配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド。
11. アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホロチオエート・オリゴデオキシヌクレオチドである請求の範囲第10項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
12. 請求の範囲第10または11項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。
13. 請求の範囲第10または11項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。
14. 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である請求の範囲第13項記載の予防および/または治療剤。
15. 式 (I)



<式中、Aは置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリールオキシアルキル、置換もしくは非置換のアラルキ-

ルオキシアルキル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキルまたはシクロアルキルアルキルを表し、

R^1 は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルを表すか、

またはAと R^1 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成し、

R^2 は水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルキルチオ、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換の複素環アルキルまたは $-NR^3R^4$ (式中、 R^3 および R^4 は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換の複素環基または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、または R^3 と R^4 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)を表し、

Xは $-C(=O)R^5$ (式中、 R^5 はヒドロキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシまたは $-NR^6R^7$ (式中、 R^6 および R^7 は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換の複素環アルキル、ヒドロキシまたは $-SO_2R^8$ (式中、 R^8 は置換もしくは非置換の低級アルキルまたは置換もしくは非置換のアリールを表す)を表すか、または R^6 と R^7 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)を表す)、ニトロ、置換もしくは非置換のヒドロキシメチルまたは1,2,3,4-テトラゾール-5-イルを表し、

Yは、水素原子、ハロゲンまたは置換もしくは非置換の低級アルキルを表す>で表されるピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。

16. Yが水素原子である請求の範囲第15項記載のGPR88の機能抑制剤。

17. R^2 が $-NR^3R^4$ (式中、 R^3 および R^4 はそれぞれ前記と同義である)である請求の範囲第15または16項記載のGPR88の機能抑制剤。

18. Xが1,2,3,4-テトラゾール-5-イルである請求の範囲第15~17項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

19. Xが $-C(=O)NR^6R^7$ (式中、 R^6 および R^7 はそれぞれ前記と同義である)である請求の範囲第15~17項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

20. Xが $-C(=O)R^{5B}$ (式中、 R^{5B} はヒドロキシまたは低級アルコキシを表す)である請求の範囲第15~17項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

21. Xが置換もしくは非置換のヒドロキシメチルである請求の範囲第15~17項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

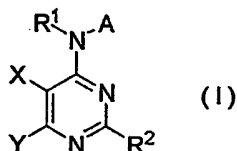
22. Aが置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキルまたは置換もしくは非置換の複素環基である請求の範囲第15～21項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

23. R¹が水素原子である請求の範囲第15～22項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

24. R³が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであるか、またはR³とR⁴が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求の範囲第17～23項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

25. R³が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであり、R⁴が水素原子または低級アルキルである請求の範囲第17～23項のいずれかに記載のGPR88の機能抑制剤。

26. 式 (I)



(式中、A、R¹、R²、XおよびYはそれぞれ前記と同義である) で表されるピリジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する中枢疾患の予防および／または治療剤。

27. Yが水素原子である請求の範囲第26項記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

28. R²が-NR³R⁴ (式中、R³およびR⁴はそれぞれ前記と同義である) である請求の範囲第26または27項記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

29. Xが1,2,3,4-テトラゾール-5-イルである請求の範囲第26～28項のいずれかに記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

30. Xが-C(=O)NR⁶R⁷ (式中、R⁶およびR⁷はそれぞれ前記と同義である) である請求の範囲第26～28項のいずれかに記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

31. Xが-C(=O)R^{5B} (式中、R^{5B}はヒドロキシまたは低級アルコキシを表す) である請求の範囲第26～28項のいずれかに記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

32. Xが置換もしくは非置換のヒドロキシメチルである請求の範囲第26～28項のいずれかに記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

33. Aが置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキルまたは置換もしくは非置換の複素環基である請求の範囲第26～32項のいずれかに記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

34. R¹が水素原子である請求の範囲第26～33項のいずれかに記載の中枢疾患の予防および／または治療剤。

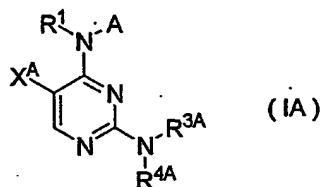
35. R³が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであるか、またはR³とR⁴が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求の範囲第28～34項

のいずれかに記載の中樞疾患の予防および／または治療剤。

36. R^3 が置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであり、 R^4 が水素原子または低級アルキルである請求の範囲第28～34項のいずれかに記載の中樞疾患の予防および／または治療剤。

37. 中樞疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である請求の範囲第26～36項のいずれかに記載の予防および／または治療剤。

38. 式 (IA)



{式中、 A および R^1 はそれぞれ前記と同義であり、 X^A は1,2,3,4-テトラゾール-5-イル、 $-C(=O)R^{5A}$ [式中、 R^{5A} はヒドロキシまたは $-NR^{6A}R^{7A}$ (式中、 R^{6A} は水素原子または低級アルキルを表し、 R^{7A} は水素原子、ヒドロキシ、ヒドロキシ低級アルキル、カルボキシ低級アルキル、 p -トルエンスルホニル、メタンスルホニルまたはトリフルオロメタンスルホニルを表す) を表す] または置換もしくは非置換のヒドロキシメチルを表し、(i) X^A が1,2,3,4-テトラゾール-5-イルであるとき、 R^{3A} および R^{4A} は、同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルを表す (ただし、同時に水素原子にはならない) か、または R^{3A} と R^{4A} が隣接する窒素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環基を形成し、(ii) X^A が $-C(=O)R^{5A}$ または置換もしくは非置換のヒドロキシメチルであるとき、 R^{3A} および R^{4A} は、同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換の複素環アルキルまたは置換もしくは非置換のアラルキルを表す (ただし、同時に水素原子にはならない) か、または R^{3A} と R^{4A} が隣接する窒素原子と一緒になって置換もしくは非置換のピペラジニル、4-メチルホモピペラジニル、4-メチルピペリジノ、4-ピペリジノピペリジノ、4-ベンジルピペリジノ、4,4-エチレンジオキシピペリジノまたはデカヒドロイソキノリン-1-イルを形成する} で表されるピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩。

39. X^A が1,2,3,4-テトラゾール-5-イルである請求の範囲第38項記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩。

40. X^A が $-C(=O)R^{5A}$ (式中、 R^{5A} は前記と同義である) である請求の範囲第38項記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩。

41. X^A が $-C(=O)OH$ である請求の範囲第38項記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に許容される塩。

42. X^A がヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチルまたは1-ヒドロキシ-1-メチルエチルである請求の範囲第38項記載のピリミジン誘導体またはその薬理的に

許容される塩。

43. Aが置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、置換もしくは非置換のアリールオキシアルキル、置換もしくは非置換の複素環基またはシクロアルキルアルキルであるか、またはAとR¹が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求の範囲第38～42項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

44. Aが置換もしくは非置換のアリール、アラルキル、複素環基またはシクロアルキルアルキルである請求の範囲第38～42項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

45. Aがベンジル、4-フェニル-n-ブチル、3-フェニルプロピル、3-フェニル-1-メチルプロピル、2-フェニルプロピル、2-フェノキシエチル、2-フェノキシ-1-メチルエチル、1,4-ベンゾジオキサン-6-イル、2-ベンジルフェニル、2-フェノキシフェニル、3-フェノキシフェニル、4-フェノキシフェニル、4-ビフェニル、ビフェニル-4-イルメチル、2-インダニルおよびシクロプロピルメチルからなる群から選ばれる基である請求の範囲第38～42項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

46. R¹が水素原子、低級アルキルまたはアラルキルである請求の範囲第38～45項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

47. R¹が水素原子である請求の範囲第38～45項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

48. R^{3A}およびR^{4A}が同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、シクロアルキルアルキル、置換もしくは非置換のアラルキルまたは置換もしくは非置換の複素環アルキルであるか、またはR^{3A}とR^{4A}が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求の範囲第38～47項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

49. R^{3A}およびR^{4A}が同一または異なって、水素原子、低級アルキル、シクロアルキルメチル、置換もしくは非置換のアラルキルまたは複素環アルキルである請求の範囲第38～47項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

50. R^{3A}が低級アルキル、シクロアルキルメチルまたは置換もしくは非置換のアラルキルであり、R^{4A}が水素原子である請求の範囲第38～47項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

51. R^{3A}が3-メトキシベンジル、3-クロロベンジル、3-フルオロベンジル、2,6-ジフルオロベンジル、2-メチルベンジル、3-トリフルオロベンジル、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、シクロヘキシルメチル、シクロヘプチル、1,5-ジメチル-n-ヘキシルおよび2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-2-イルメチルからなる群から選ばれる基であり、R^{4A}が水素原子であるか、R^{3A}がベンジルでありR^{4A}がn-ブチルであるか、R^{3A}がn-ヘキシルでありR^{4A}がメチルであるか、またはR^{3A}とR^{4A}が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求の範囲第38および40～47項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容さ

れる塩。

52. R^{3A} が3-メトキシベンジル、3-クロロベンジル、3-フルオロベンジル、2,6-ジフルオロベンジル、2-メチルベンジル、3-トリフルオロベンジル、シクロヘキシルメチル、シクロヘプチルおよび1,5-ジメチル-n-ヘキシルからなる群から選ばれる基であり、 R^{4A} が水素原子であるか、 R^{3A} がベンジルであり R^{4A} がn-ブチルであるか、 R^{3A} がn-ヘキシルであり R^{4A} がメチルであるか、または R^{3A} と R^{4A} が隣接する窒素原子と一緒にあって4-ベンジルピペリジノ、4,4-エチレンジオキシピペリジノもしくはデカヒドロイソキノリン-1-イルを形成する請求の範囲第39項記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

53. 式(IA)で表される化合物が、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボヒドロキサム酸、[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]アミノ酢酸、[[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]メチルアミノ]酢酸、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン、N-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]-4-メチルベンゼンスルホンアミド、N-[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]メタンスルホンアミド、[4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(シクロヘキシルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボニル]トリフルオロメタンスルホンアミド、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-4-(1-メチル-2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(4-フェニルピペリジン-1-イル)-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(1-メチル-2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、2-(ベンジルブチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、5-ヒドロキシメチル-2-(オクタヒドロイソキノリン-2-イル)-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジン、2-(シクロヘキシルメチルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン、5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェニルプロピルアミノ)-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン、5-ヒドロキシメチル-4-(4-フェニルピペリジン-1-イル)-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(3-クロロベンジルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2-ベンジルフェニルアミノ)-2-(3-フルオロベンジルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(ベンジルブチルアミノ)-4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(3-メトキシベンジルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(2,6-ジフルオロベンジルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(2-メチルベンジルアミノ)-4-(2-フェノキシフェニルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2-フェノキシフェニルアミノ)-2-(3-トリフルオロベンジルアミノ)ピリミジ

ン-5-カルボン酸、2-(3-フルオロベンジルアミノ)-4-(4-フェニルブチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、2-(ベンジルブチルアミノ)-4-(4-ビフェニルメチルアミノ)ピリミジン-5-カルボン酸、4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-(3-トリフルオロメチルベンジルアミノ)ピリミジン、4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-2-(2-ピリジルメチルアミノ)ピリミジンおよび 2-[ビス(2-メトキシエチル)アミノ]-4-(2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]ジオキシン-6-イルアミノ)-5-ヒドロキシメチルピリミジン、2-(3-フルオロベンジルアミノ)-5-ヒドロキシメチル-4-(2-フェノキシエチルアミノ)ピリミジンからなる群から選択される化合物であるピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩。

54. 請求の範囲第38～53項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬。

55. 請求の範囲第38～53項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有するGPR88の機能抑制剤。

56. 請求の範囲第38～53項のいずれかに記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤。

57. 中枢疾患がパーキンソン病、うつ病および時差ぼけからなる群から選ばれる疾患である請求の範囲第56項記載の予防および/または治療剤。

58. 中枢疾患の予防および/または治療剤の製造のための、GPR88の機能抑制作用を有する物質の使用。

59. GPR88の機能抑制剤の製造のための、配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

60. GPR88の機能抑制剤の製造のための、請求の範囲第15項記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩の使用。

61. 中枢疾患の予防および/または治療剤の製造のための、請求の範囲第15項記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩の使用。

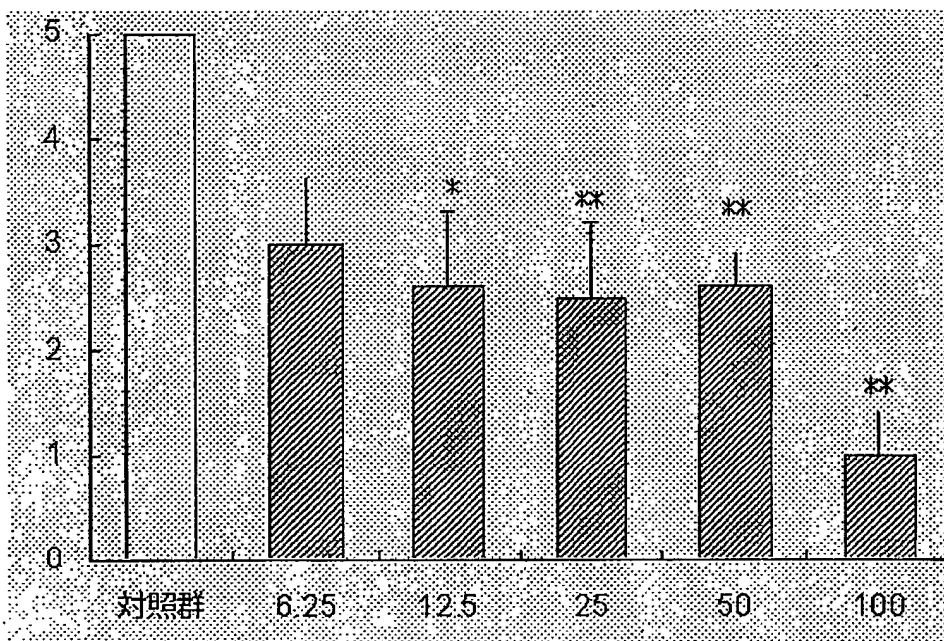
62. GPR88の機能抑制作用を有する物質の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患の予防および/または治療方法。

63. 配列番号1、3または5で表される塩基配列の連続する10塩基以上の配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とするGPR88の機能抑制方法。

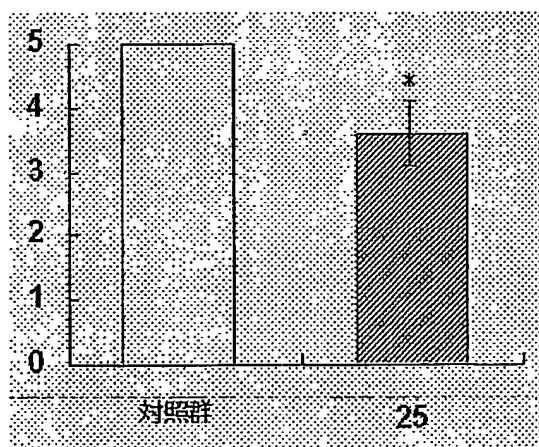
64. 請求の範囲第15項記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とするGPR88の機能抑制方法。

65. 請求の範囲第15項記載のピリミジン誘導体またはその薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患の予防および/または治療方法。

第1図



第2図



配 列 表

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> Preventive and/or therapeutic agents for central nervous system diseases

<130> 11523W01

<140>

<141>

<150> JP 2002-362196

<151> 2002-12-13

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3483

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Inventor: Natsume, Ayumi; Sasaki, Katsutoshi; Hagihara, Koji

Inventor: Aoyama, Shirou; Nonaka, Hiromi; Arai, Hitoshi

Inventor: Shiozaki, Shizuo; Kuwana, Yoshihisa

<220>

<221> source

<222> (1).. (3483)

<223> /organism="Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (438).. (1592)

<223>

<400> 1

gggttccaca tcagccacca ctctgtcttc tgagcacagg gtgctctcct cttgagctca 60

gcttctgatt ttgcagccaa gcattcttgc tgtgtgtgcc tgcttgccca cccgcctggg . 120

cttgagcccc gccactttac tttctccagc cctgatacca gctgagaagt ctccctgcag 180

ctgctagtgc ctgccagga ccatgtgtgt ggatgtgtgt tgggagaagc gggcacttgc 240

tcctggcact gatccagct gagtttctcc tgttgatttc tggaccactg atgtgtttgc 300

tgaggaggta tttctggca tccctcccc tgagacaccg gctaaggacc agcctaaacg 360

caaggcagga cagtgtcagg atggaccgog ctgccagaag ccgacgctag cgaggagggt 420

gtgaagagtt ggccaga atg acc aac tcc tcc tcc aca tcc acc tcc tcc 470

Met Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Ser

1

5

10

acc acc ggt ggc tgc ctg ctg ctg ctc tgc gag gaa gag gag tgc tgg 518

Thr Thr Gly Gly Ser Leu Leu Leu Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ser Trp

15

20

25

gcg ggc cgg cgc atc ccg gtg tca ctc ctg tat tgc ggc ctg gcc atc 566

Ala Gly Arg Arg Ile Pro Val Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Leu Ala Ile

30

35

40

ggg ggc acg ctg gcc aac ggc atg gtc atc tat ctc gtg tgc tcc ttc 614

Gly Gly Thr Leu Ala Asn Gly Met Val Ile Tyr Leu Val Ser Ser Phe

45

50

55

cga aag ctg cag acc acc agc aac gcc ttc att gtg aac ggc tgc gcc 662

Arg Lys Leu Gln Thr Thr Ser Asn Ala Phe Ile Val Asn Gly Cys Ala

60	65	70	75	
ggc gac ctc agc gtc tgc gcc ctc tgg atg ccg cag gag gcg gtg ctc				710
Ala Asp Leu Ser Val Cys Ala Leu Trp Met Pro Gln Glu Ala Val Leu				
	80	85	90	
ggg ctc ctg ccc acc ggc tct gcg gag ccc ccc gca gac tgg gac ggc				758
Gly Leu Leu Pro Thr Gly Ser Ala Glu Pro Pro Ala Asp Trp Asp Gly				
	95	100	105	
gct ggg ggc agc tac cgc ctg cta cgg ggt ggg ctg ctg ggc ctc gga				806
Ala Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Leu Gly Leu Gly				
	110	115	120	
ctc acg gtg tcc ctc ctc tcc cac tgc ctc gtg gcc ctg aac cgc tac				854
Leu Thr Val Ser Leu Leu Ser His Cys Leu Val Ala Leu Asn Arg Tyr				
	125	130	135	
ctg ctc atc acc cgg gcg ccc gcc acc tac cag gcg ctg tac cag agg				902
Leu Leu Ile Thr Arg Ala Pro Ala Thr Tyr Gln Ala Leu Tyr Gln Arg				
	140	145	150	155
cgc cac acg gcg ggc atg ctg gcg ctg tcc tgg gcg ctc gcc ctg ggc				950
Arg His Thr Ala Gly Met Leu Ala Leu Ser Trp Ala Leu Ala Leu Gly				
	160	165	170	
ctc gtg ctg ctg ctc ccg ccc tgg gca ccg cgg ccc ggc gcc gcg cca				998
Leu Val Leu Leu Leu Pro Pro Trp Ala Pro Arg Pro Gly Ala Ala Pro				
	175	180	185	
ccg cga atc cac tac ccg gcg ctg ctg gcc gcc gcg gcg ctg ctg gcg				1046
Pro Arg Ile His Tyr Pro Ala Leu Leu Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala				
	190	195	200	
cag aca gct ctg ctg ctg cac tgc tac ctg ggc atc gtg cgc cgc gtg				1094
Gln Thr Ala Leu Leu Leu His Cys Tyr Leu Gly Ile Val Arg Arg Val				

205	210	215	
cgt gtc agc gtc aag cgg gtc agc gtg ctc aac ttc cac ctg ctg cac			1142
Arg Val Ser Val Lys Arg Val Ser Val Leu Asn Phe His Leu Leu His			
220	225	230	235
cag ttg ccc ggc tgc gcc gcc gcc gcc gcc gcc ttc ccg ggc gcc cag			1190
Gln Leu Pro Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Phe Pro Gly Ala Gln			
240	245	250	
cac gcg ccg ggc ccc ggt ggc gcc gcg cac ccg gcg cag gcc cag ccc			1238
His Ala Pro Gly Pro Gly Gly Ala Ala His Pro Ala Gln Ala Gln Pro			
255	260	265	
ctg ccg ccc gcg ctg cac ccg cgg cgg gca cag cgg cgt ctc agc gcc			1286
Leu Pro Pro Ala Leu His Pro Arg Arg Ala Gln Arg Arg Leu Ser Gly			
270	275	280	
ctg tcg gtg ctg ctg ctc tgc tgc gtc ttc ctg ctg gcc acg cag cca			1334
Leu Ser Val Leu Leu Leu Cys Cys Val Phe Leu Leu Ala Thr Gln Pro			
285	290	295	
ctg gtg tgg gtg agc ctg gcc agc ggc ttc tcg ctg ccg gtg ccc tgg			1382
Leu Val Trp Val Ser Leu Ala Ser Gly Phe Ser Leu Pro Val Pro Trp			
300	305	310	315
gga gtg cac gcg gcc agc tgg ctc ctg tgc tgc gcc ctg tcc gcg ctc			1430
Gly Val His Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Cys Ala Leu Ser Ala Leu			
320	325	330	
aac ccg ctg ctc tac acg tgg agg aac gag gag ttc cgc cgc tcc gtg			1478
Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Trp Arg Asn Glu Glu Phe Arg Arg Ser Val			
335	340	345	
cgc tca gtc ctg ccg ggc gtc ggc gac gcg gcg gcc gct gcc gtt gcc			1526
Arg Ser Val Leu Pro Gly Val Gly Asp Ala Ala Ala Ala Val Ala			

350	355	360	
gcc aca gcc gtg ccc gca gtg tcc cag gcg caa ctg ggc acc cgc gcc			1574
Ala Thr Ala Val Pro Ala Val Ser Gln Ala Gln Leu Gly Thr Arg Ala			
365	370	375	
gcg ggc cag cac tgg taa cctagccggg gcccaggga agcggagatc			1622
Ala Gly Gln His Trp			
380			
cccggttcc gacgtccttg ggcaccgtcg cctccttccc tcctaggga tcccctgcct			1682
gaacgaagac ttccgccgcg aagcccgata gatcggggga aaatggggcc ttcgaccca			1742
gcgggctacc tgaaccaagg cgtctctcta agtggggcgc ccgaagtcac tttggacggc			1802
cacctgattt ttaccctttg tttctgtgtt ttagaggaat cctaaagtca aaacaccaga			1862
gacttgaaga acttgcaaac tggcgtttta aaataaccgg ttaatttatt tccacacagt			1922
ttgtttttga aaaagagctt tcataatgta taaccctttc cactttcatc gtcttatata			1982
tgaagcgctt tgagtgtgca tgaaccaaag gaaataacat tgaagaagga aaacaatatg			2042
tagaaagtat tttagaaagt aacctgtctt tgatgatgct tctcttacca tttagttttt			2102
gtatattacc ctggggcagt gaagccctag gtgtgccac cagtatgagt tgccattaag			2162
acctcaagcc ctttattctt aaaagggttt ttaataaagt ctttctcaaa tgaggtagaa			2222
tcttagccag tgagaaaaaa aattatttta tgctcctttt ttttcgcact cttagactg			2282
aaaattggcg ttgagtgtta tagtgaaaat tttccagttt gataattgat ggtcagagcc			2342
agcactggaa ttttgaaaac aaataaggtg attatctatt ttaggtaccg tttcacattt			2402

tctatagcat gcacacttgt tgctaccctc attttgtaac caatttattt gccttatgaa 2462

tgtgattgca gctttgaaca ttctgtactg taatgggtgc taagaagaat aagtccttct 2522

gttttctctt taacatttaa aatatctcaa tgcacatgat ataattaaac actaataata 2582

ccatgactgc atagctaata ttagctgcta ttgcatgctc ctagatgcta gaacttattg 2642

ggcatgtggt atactgaagc gatacccggt agacaaggat attttacttc ttccagacac 2702

cagaagaaat ggccttcaat tatttgaaaa gagacacaga gacacctctg gctacctaga 2762

gttcttctctg tcttgaccaa tttatgagaa agctcccagt tgggacttta tctcacaagt 2822

ggaatcacag tcaagacgga tcaataatat gggtggctca gcaaagccag ctgtgctctt 2882

ttagggttta aacaagccac acgttagaaa gcaacactgt ttttatgtag ttcatatata 2942

ttaccacgac atttaacatc aatattgtat atgttgaagg aggtataata aactcagtca 3002

tatatagtga acagttcaaa tgggaaagtg ttctaaaaca tattatttga ggtttgcacat 3062

attcatcttt ggtttactaa atttacttag aaatatttga aatgcaaaat tgtgtgaaat 3122

caccttatca aattaaaatg ggaagaaagt aattttaata atttttaata atcatatgtc 3182

agcattctga ctacttacca catcaaactt ggcccacaaac agcctcagtt aactgcataa 3242

ttcaggaaca aaaccagctt gctttgttgc acgcctgggc aatttcagcc aggacattag 3302

gaccacttgt tgtacatctg aataattatg gaagttggga catgttaagg aaaacaaata 3362

tggtcatcac caacaatcag ctgtcatttt attaatctat cccttttgtg catgcaccat 3422

ttctctctta ctaacagttt catctgttca cattttctct gattcaaata ttaaagttca 3482

g

3483

<210> 2

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Ser Thr Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ser Trp Ala Gly Arg Arg Ile
20 25 30

Pro Val Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Leu Ala Ile Gly Gly Thr Leu Ala
35 40 45

Asn Gly Met Val Ile Tyr Leu Val Ser Ser Phe Arg Lys Leu Gln Thr
50 55 60

Thr Ser Asn Ala Phe Ile Val Asn Gly Cys Ala Ala Asp Leu Ser Val
65 70 75 80

Cys Ala Leu Trp Met Pro Gln Glu Ala Val Leu Gly Leu Leu Pro Thr
85 90 95

Gly Ser Ala Glu Pro Pro Ala Asp Trp Asp Gly Ala Gly Gly Ser Tyr

100 105 110
Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Leu Gly Leu Gly Leu Thr Val Ser Leu
115 120 125
Leu Ser His Cys Leu Val Ala Leu Asn Arg Tyr Leu Leu Ile Thr Arg
130 135 140
Ala Pro Ala Thr Tyr Gln Ala Leu Tyr Gln Arg Arg His Thr Ala Gly
145 150 155 160
Met Leu Ala Leu Ser Trp Ala Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Leu Leu
165 170 175
Pro Pro Trp Ala Pro Arg Pro Gly Ala Ala Pro Pro Arg Ile His Tyr
180 185 190
Pro Ala Leu Leu Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Gln Thr Ala Leu Leu
195 200 205
Leu His Cys Tyr Leu Gly Ile Val Arg Arg Val Arg Val Ser Val Lys
210 215 220
Arg Val Ser Val Leu Asn Phe His Leu Leu His Gln Leu Pro Gly Cys
225 230 235 240
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Phe Pro Gly Ala Gln His Ala Pro Gly Pro

245

250

255

Gly Gly Ala Ala His Pro Ala Gln Ala Gln Pro Leu Pro Pro Ala Leu
260 265 270

His Pro Arg Arg Ala Gln Arg Arg Leu Ser Gly Leu Ser Val Leu Leu
275 280 285

Leu Cys Cys Val Phe Leu Leu Ala Thr Gln Pro Leu Val Trp Val Ser
290 295 300

Leu Ala Ser Gly Phe Ser Leu Pro Val Pro Trp Gly Val His Ala Ala
305 310 315 320

Ser Trp Leu Leu Cys Cys Ala Leu Ser Ala Leu Asn Pro Leu Leu Tyr
325 330 335

Thr Trp Arg Asn Glu Glu Phe Arg Arg Ser Val Arg Ser Val Leu Pro
340 345 350

Gly Val Gly Asp Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Thr Ala Val Pro
355 360 365

Ala Val Ser Gln Ala Gln Leu Gly Thr Arg Ala Ala Gly Gln His Trp
370 375 380

<210> 3
 <211> 3419
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> source
 <222> (1).. (3419)
 <223> /organism="Mus musculus"

<220>
 <221> CDS
 <222> (414).. (1568)
 <223>

<400> 3
 ttggagcaca ggtgcgctc ctctccagct cagtttcttc tgctcttgta gccaggcatc 60
 ttgcgtgctg ctgcctgcct gccaccctc ctgggcttgc agcctaccgc ttgactttct 120
 ccaattctac tgccagctga ggagactccc cacagctgtt ggctcctgcc tgggaccatg 180
 tgtggggatg ctgcacggga gaagcaaggc gcttgctcct ggcacgggtc ccagctcagt 240
 ttctcctgtt gacttctgga ccacagatgc tgctgccgag gaggtatttc ctggcatctc 300
 tccctctgct atcaccagct aaggactggc cccaaatcaa gcaggcaagt gccaggatgg 360
 gccacgtac acgaagccaa cgctagggcg cgagggtgtga agagttggcc aga atg 416
 Met
 1
 acc aac tcc tcc tcc act tcg acc tcc acc act acc ggg gga tcg ctg 464

Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu	
5 10 15	
ctg ctg ctc tgc gag gaa gaa gaa tgc tgg gcg ggc cgg cgg atc ccg	512
Leu Leu Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ser Trp Ala Gly Arg Arg Ile Pro	
20 25 30	
gtg tct ctc ctg tac tgc ggc ctg gcc atc ggg ggc acg ctg gcc aac	560
Val Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Leu Ala Ile Gly Gly Thr Leu Ala Asn	
35 40 45	
ggt atg gtc atc tat ctc gtg tgc tcc ttc cga aag ctg cag acc acc	608
Gly Met Val Ile Tyr Leu Val Ser Ser Phe Arg Lys Leu Gln Thr Thr	
50 55 60 65	
agc aac gcc ttc atc gtg aat ggc tgc gcc gcg gat ctc agc gtc tgc	656
Ser Asn Ala Phe Ile Val Asn Gly Cys Ala Ala Asp Leu Ser Val Cys	
70 75 80	
gcc ctc tgg atg cca cag gag gcg gtg ctg ggg ctc ctg ccc tgc ggc	704
Ala Leu Trp Met Pro Gln Glu Ala Val Leu Gly Leu Leu Pro Ser Gly	
85 90 95	
tcc gcg gag ccc ccg ggg gac tgg gac ggt ggc gga ggc agc tac cgc	752
Ser Ala Glu Pro Pro Gly Asp Trp Asp Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Arg	
100 105 110	
ctg ctc cgg ggc ggg ttg ttg ggc ctc ggg ctc act gtg tcc ctt ctg	800
Leu Leu Arg Gly Gly Leu Leu Gly Leu Gly Leu Thr Val Ser Leu Leu	
115 120 125	
tcc cat tgc ctc gtg gcg ctg aac cgc tac ctg ctc atc acc agg gcg	848
Ser His Cys Leu Val Ala Leu Asn Arg Tyr Leu Leu Ile Thr Arg Ala	
130 135 140 145	
cct gcc acc tac cag gtg ctc tac caa cgg cgc cac acg gtg ggc atg	896

Pro Ala Thr Tyr Gln Val Leu Tyr Gln Arg Arg His Thr Val Gly Met	
150 155 160	
ctg gca ctg tcc tgg gcg ctc gcc ttg ggt ctg gtg ctg ctg ctc ccg	944
Leu Ala Leu Ser Trp Ala Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Leu Leu Pro	
165 170 175	
ccc tgg gct cct aag ccc gga gcc gag cca ccg caa gtc cac tac ccc	992
Pro Trp Ala Pro Lys Pro Gly Ala Glu Pro Pro Gln Val His Tyr Pro	
180 185 190	
gcg ctc ctg gcg gcg gga gcg ctg ctt gcg cag acg gcg ctg ctg ttg	1040
Ala Leu Leu Ala Ala Gly Ala Leu Leu Ala Gln Thr Ala Leu Leu Leu	
195 200 205	
cac tgc tac ctg ggc atc gtg cgc cgc gtg cgc gtc agc gtc aag cgg	1088
His Cys Tyr Leu Gly Ile Val Arg Arg Val Arg Val Ser Val Lys Arg	
210 215 220 225	
gtc agc gtg ctc aac ttc cac ctg ctg cac cag cta ccc ggc tgc gcc	1136
Val Ser Val Leu Asn Phe His Leu Leu His Gln Leu Pro Gly Cys Ala	
230 235 240	
gcc gcc gcc gcc gcc ttc ccc gcc gcc ccg cac gcg ccg ggt ccg gga	1184
Ala Ala Ala Ala Ala Phe Pro Ala Ala Pro His Ala Pro Gly Pro Gly	
245 250 255	
ggc gcc gcg cat ccc gcg cag cct caa ccc ctg ccg gcc gct ctg cag	1232
Gly Ala Ala His Pro Ala Gln Pro Gln Pro Leu Pro Ala Ala Leu Gln	
260 265 270	
cct cgc cgg gcg cag cgg cgt ctc agc gcc ttg tcg gtg ctg ctg ctc	1280
Pro Arg Arg Ala Gln Arg Arg Leu Ser Gly Leu Ser Val Leu Leu Leu	
275 280 285	
tgc tgc gtc ttc ctg ctg gcc acg cag ccg ctg gtg tgg gtg agc ctg	1328

Cys Cys Val Phe Leu Leu Ala Thr Gln Pro Leu Val Trp Val Ser Leu	
290	305
gcc agt ggc ttc tcc ctc ccg gtg ccc tgg ggc gtg cag gcg gcc agc	1376
Ala Ser Gly Phe Ser Leu Pro Val Pro Trp Gly Val Gln Ala Ala Ser	
310	320
tgg ctc ctg tgc tgc gcc ctg tcg gcg ctc aac ccg ctg ctc tac acg	1424
Trp Leu Leu Cys Cys Ala Leu Ser Ala Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Thr	
325	335
tgg agg aac gag gag ttc cgc aga tcc gtg cga tct gtc ctg ccg ggc	1472
Trp Arg Asn Glu Glu Phe Arg Arg Ser Val Arg Ser Val Leu Pro Gly	
340	350
gtc ggg gac gcg gct gcg gcc gcc gcg gcc gcc acc gcg gtg cca gcc	1520
Val Gly Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Pro Ala	
355	365
atg tcc cag gcg caa ctg ggt acc cgg gcg gct ggc cag cac tgg taa	1568
Met Ser Gln Ala Gln Leu Gly Thr Arg Ala Ala Gly Gln His Trp	
370	380
cacaccttgc ttggagaggc ttctaagcc acctgccgca ctgcctcctt cttttgtaag	1628
ctatccccag cccagggaa gatccagtg gagaacattt tgccttcctc ccagtgcaa	1688
taccagaacc aaggtcttcc cctaaaggga gtcccaattg tgtgcggcca ttgaagtta	1748
cccttttggt tctgtgtttt aaagacaccc gtgggtccat ccagacactc agactgcaag	1808
gacttgtaaa ctggcatttt tagagaacca gttaatttat ttcaagtttg ctttggaana	1868
agagctttca taccataacg tacaaccctt ccaacctcca ccgtcttata tacgaaacgc	1928
cttgagtgtg tgtgtgcatg agccaaaggg aataccgttg atgaagagac tgtgtgtaga	1988

tagtatecta accacacttt cttctgtag agtttagtct ttgtatattg acctggaaga 2048

gtgaaaccac aggtgtgtac accgtcgtga gttgccactg agacctcagg ccctttattc 2108

ttaaaagggc tttttttatt gagtcathtt tgaaatgaga ttgactctca gccagtgagg 2168

aaacaaacca aattttattat ttactctcc tctctattta tttctaaggt ggaaagctac 2228

cgtcgagtgt taaagcgaaa aaatgtcaag ttttgattg gtcagaaacc acaaatggaa 2288

ttttaaaagc aaaaacaggg ggagctatct attttgggta gcactttcac atattctgaa 2348

gcatgcacac ttcttgctac ccacatttgt aactgattta tttgcctctg agtgtgattg 2408

cagctttgaa cattctgtac tataatggtt gctaagggga atgactcctg tagtctcttt 2468

aaaatatctc aatgcacatg acataattaa acactaatac cataattgca tagctaattg 2528

tagctgccat tgcattgctc tagatgtag aacttaactgg gcatgtggta cacaaagcaa 2588

taccattag acaaggacat ttacttctt ccagacacca gaagaaaagg tcttttaatc 2648

atctgaaaag agatgtagat gaaccctgg ctcctacag ttcttgtctt gacctggctt 2708

atgagaaaac tccatttgg ggactttatc tccaaatga aaccaatggt cagggtgata 2768

aaattcagat tggtccatc aagttacctg tgcgttttag gggtaacaa gccacacgtt 2828

aggaagtaac actgttttat gttgttcata tatattacaa aaacatttat tattagtatc 2888

atgtctgttg aagatggaat caggcagaca gttatgcaga aggagaatat ttcgaatggg 2948

actctgttct ccaatgtatc agttgagggt tgcagtcttc atctttgatt tcctaaatgt 3008

atagatgcat ttacaatgta caaaaaacaa aaacaaaaac actgaaatcg ttttgtaaaa 3068

ttaaacaggg aagaaagtaa caggaggcct agaccagtct gttatccaca taaaatctgg 3128
 ggccaaatag cctcaattaa ctgtgtaatt caggagcaaa gacagcttgc tttgttgac 3188
 tcttgacca agaatggtaa gaacatttgt atttttgaaa aaattgggag acacgggaaa 3248
 cagatatttt atagcaaggc aaaataaaat aaatatgttt gtcactaaca atacgttggc 3308
 agtcatgtca ttaaccaaac tgtgtgcatg ttgtcatttt tctcttacga agatttcttc 3368
 tgtttccagt ttctggatt cacatattta attaaagttt ccataaatgc t 3419

<210> 4

<211> 384

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ser Trp Ala Gly Arg Arg Ile
 20 25 30

Pro Val Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Leu Ala Ile Gly Gly Thr Leu Ala
 35 40 45

Asn Gly Met Val Ile Tyr Leu Val Ser Ser Phe Arg Lys Leu Gln Thr
 50 55 60

Thr Ser Asn Ala Phe Ile Val Asn Gly Cys Ala Ala Asp Leu Ser Val
65 70 75 80

Cys Ala Leu Trp Met Pro Gln Glu Ala Val Leu Gly Leu Leu Pro Ser
85 90 95

Gly Ser Ala Glu Pro Pro Gly Asp Trp Asp Gly Gly Gly Gly Ser Tyr
100 105 110

Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Leu Gly Leu Gly Leu Thr Val Ser Leu
115 120 125

Leu Ser His Cys Leu Val Ala Leu Asn Arg Tyr Leu Leu Ile Thr Arg
130 135 140

Ala Pro Ala Thr Tyr Gln Val Leu Tyr Gln Arg Arg His Thr Val Gly
145 150 155 160

Met Leu Ala Leu Ser Trp Ala Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Leu Leu
165 170 175

Pro Pro Trp Ala Pro Lys Pro Gly Ala Glu Pro Pro Gln Val His Tyr
180 185 190

Pro Ala Leu Leu Ala Ala Gly Ala Leu Leu Ala Gln Thr Ala Leu Leu
195 200 205

Leu His Cys Tyr Leu Gly Ile Val Arg Arg Val Arg Val Ser Val Lys
210 215 220

Arg Val Ser Val Leu Asn Phe His Leu Leu His Gln Leu Pro Gly Cys
225 230 235 240

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Phe Pro Ala Ala Pro His Ala Pro Gly Pro
245 250 255

Gly Gly Ala Ala His Pro Ala Gln Pro Gln Pro Leu Pro Ala Ala Leu
260 265 270

Gln Pro Arg Arg Ala Gln Arg Arg Leu Ser Gly Leu Ser Val Leu Leu
275 280 285

Leu Cys Cys Val Phe Leu Leu Ala Thr Gln Pro Leu Val Trp Val Ser
290 295 300

Leu Ala Ser Gly Phe Ser Leu Pro Val Pro Trp Gly Val Gln Ala Ala
305 310 315 320

Ser Trp Leu Leu Cys Cys Ala Leu Ser Ala Leu Asn Pro Leu Leu Tyr
325 330 335

Thr Trp Arg Asn Glu Glu Phe Arg Arg Ser Val Arg Ser Val Leu Pro
340 345 350

Gly Val Gly Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Pro
 355 360 365

Ala Met Ser Gln Ala Gln Leu Gly Thr Arg Ala Ala Gly Gln His Trp
 370 375 380

<210> 5

<211> 4145

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> source

<222> (1).. (4145)

<223> /organism="Rattus norvegicus"

<220>

<221> CDS

<222> (449).. (1603)

<223>

<400> 5

gagatagggt gcgtcctctt ccagctcagc ttctgtcttt gcagccagac atcctcgtg 60

ttgtgtgtgc tgcgtgtgcc gcctgcctgc ctgcctgcct gcctgcctgc ctgcctgccc 120

accctcctgg acttgcagcc tacgcttga cttttctccc aattctactg ccagctgagg 180

agactcccca cagctgctgg ctctgcctg ggaccatgtg tgcgaatgct gcacgggaaa 240

agcaaggcgt ttgtcctgg catggatccc agcgcagttt ctctgttga cttctggacc 300

gcagatgcag ctgctgaggt atttcctggc atctctccct ctgctatcac cagctaagga 360

ctggccccaa atcaagcagg caagtgtcgg gatgggccac gctacaccaa gccaacgcta 420

gggcgcgagg tgtgaagagt tggccaga atg acc aac tcc tcc tcc act tcg 472
Met Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ser
1 5

acc tcc acc acc acc gga gga tcc ctg ctg ctg ctc tgc gag gaa gaa 520
Thr Ser Thr Thr Thr Gly Gly Ser Leu Leu Leu Leu Cys Glu Glu Glu
10 15 20

gaa tcg tgg gcg ggc cgg cgg atc ccg gtg tct ctc ctg tac tcg ggg 568
Glu Ser Trp Ala Gly Arg Arg Ile Pro Val Ser Leu Leu Tyr Ser Gly
25 30 35 40

ctg gcc atc ggg ggc acg ctg gcc aac ggt atg gtc atc tat ctt gtg 616
Leu Ala Ile Gly Gly Thr Leu Ala Asn Gly Met Val Ile Tyr Leu Val
45 50 55

tcg tcc ttc cga aag ctg cag acc acc agc aac gcc ttc att gtg aat 664
Ser Ser Phe Arg Lys Leu Gln Thr Thr Ser Asn Ala Phe Ile Val Asn
60 65 70

ggc tgc gcc gcg gat ctc agc gtc tgc gcc ctc tgg atg cca cag gag 712
Gly Cys Ala Ala Asp Leu Ser Val Cys Ala Leu Trp Met Pro Gln Glu
75 80 85

gcg gta ctg ggg ctc ctg ccc gcc ggc tcc gcg gag ccc ccg ggg gac 760
Ala Val Leu Gly Leu Leu Pro Ala Gly Ser Ala Glu Pro Pro Gly Asp
90 95 100

tgg gac agt ggc gga ggc agc tac aga ctg ctc cgg ggc ggg ttg ttg 808
Trp Asp Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Leu
105 110 115 120

ggc ctc ggg ctc act gtg tcc ctt ctg tcc cat tgc ctc gtg gct ctg	856
Gly Leu Gly Leu Thr Val Ser Leu Leu Ser His Cys Leu Val Ala Leu	
125 130 135	
aac cgc tac ttg ctc atc acc agg gcg cct gcc acc tac cag gtg ctg	904
Asn Arg Tyr Leu Leu Ile Thr Arg Ala Pro Ala Thr Tyr Gln Val Leu	
140 145 150	
tac cag cgg cgc cac acg gcg ggc atg ctg gca ctg tcc tgg gcg ctc	952
Tyr Gln Arg Arg His Thr Ala Gly Met Leu Ala Leu Ser Trp Ala Leu	
155 160 165	
gcc ttg ggt ctg gtg ttg ttg ctc ccg cct tgg gct ccc aag ccg gga	1000
Ala Leu Gly Leu Val Leu Leu Leu Pro Pro Trp Ala Pro Lys Pro Gly	
170 175 180	
gcg gag ccc ccg caa gtc cac tac ccc gcg ctc ctg gcg gcg gga gcg	1048
Ala Glu Pro Pro Gln Val His Tyr Pro Ala Leu Leu Ala Ala Gly Ala	
185 190 195 200	
ttg ctg gca cag acg gcg ctg ctg ctg cac tgc tac ctg ggc atc gtg	1096
Leu Leu Ala Gln Thr Ala Leu Leu Leu His Cys Tyr Leu Gly Ile Val	
205 210 215	
cgc cgc gtg cgc gtc agc gtc aag cgg gtc agc gtg ctc aac ttc cac	1144
Arg Arg Val Arg Val Ser Val Lys Arg Val Ser Val Leu Asn Phe His	
220 225 230	
ctg ctg cat cag cta ccg ggc tgc gcc gcc gcc gcc gcc gcc ttc ccc	1192
Leu Leu His Gln Leu Pro Gly Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Phe Pro	
235 240 245	
gcc gcc ccg cac gct ccg ggt gcc gga ggc gcc gct cat ccc gcg cag	1240
Ala Ala Pro His Ala Pro Gly Ala Gly Gly Ala Ala His Pro Ala Gln	
250 255 260	

cct caa ccc ctg ccg gcc gcc ctg cag cct cgt cgg gcg cag cgg cgt 1288
 Pro Gln Pro Leu Pro Ala Ala Leu Gln Pro Arg Arg Ala Gln Arg Arg
 265 270 275 280

ctc agc ggt ttg tct gtg ctg ctg ctc tgc tgc gtc ttc ctg ctg gcc 1336
 Leu Ser Gly Leu Ser Val Leu Leu Leu Cys Cys Val Phe Leu Leu Ala
 285 290 295

acg cag ccg ctg gtg tgg gtg agc ctg gcc agc ggc ttc tcc ctc ccg 1384
 Thr Gln Pro Leu Val Trp Val Ser Leu Ala Ser Gly Phe Ser Leu Pro
 300 305 310

gtg ccc tgg ggc gtg cag gcg gcc agc tgg ctc ctg tgc tgc gcc ctg 1432
 Val Pro Trp Gly Val Gln Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Cys Ala Leu
 315 320 325

tcg gcg ctc aac ccg ctg ctc tac act tgg agg aac gag gag ttc cgc 1480
 Ser Ala Leu Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Trp Arg Asn Glu Glu Phe Arg
 330 335 340

aga tca gtg cgt tca gtt ctg ccc ggc gtc ggg gac gca gct gcg gcc 1528
 Arg Ser Val Arg Ser Val Leu Pro Gly Val Gly Asp Ala Ala Ala Ala
 345 350 355 360

gct gca gcc gcc acc gcg gtg cca gcc atg tcc cag gcg caa ctg ggt 1576
 Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Pro Ala Met Ser Gln Ala Gln Leu Gly
 365 370 375

acc cgg gcg gct ggc cag cat tgg taa cacaccttc ttggaggggc 1623
 Thr Arg Ala Ala Gly Gln His Trp
 380

ttccctaagct acttgcgcga ccgcaccacc tctttctttt gtaagctatc cccgtccct 1683

gggaagatcc cggtaggagga gattttcgtc ttctttccta gtgcaatacc tgaaccaagg 1743

tcttccccta aatggagccc aattgtgtgc ggccattoga cttttacctt tttgttgtg 1803
tgttctaaag acacccttag gtccattcag acaccagat cgcaaggact tgtaaactgg 1863
cattttaaaa gaaccggtta atttatttca agcttgcttt tgaaaaagaa ctttcatagc 1923
aaacaaccct tccgacctcc accgtcttac attcgaagcg ccttgagtgt gtgggtgtgc 1983
atgagccaaa ggtaacaccg tggaggaata cattgtgtgt gtgtgtgtgt agacagtatt 2043
ctaaccatgc ttccttctgt ttagttag tctttgtata ttgacctoga agagtgaaac 2103
cacaggtgtg tacacgggcg tgagttgcca ttgagcccc aagccctta ttcttaaaag 2163
ggtttgtttt ttttcttttc tttttaaatt gagtcathtt tgaaatgaga tcgactctca 2223
agccagttag gaaacaaacc aaatgtatta ttttactctc ctctttattc ctttctaagg 2283
tggaaggtta ccgtcgagta ttaaagtga aaaaaatgac aagttttgga tgggccgaaa 2343
ctagaaatgg aattttgaaa gcaaaaaaaaa ggggggggag gggctatcta ttttaggtcg 2403
cagtttcaca ttttctaagg catgcatact tcttgctacc ctcathttga accgacttat 2463
ttgcctctga gtgtgatcgc aactttgaac attctgtact ataatggttg ctagggagga 2523
tgactcctgt attctcttta agatatctca atgcacatga cataattaaa cactgatacc 2583
ataattgcat agctaattgt agctgctatt gcatgctcct agatgctaga acttatcggg 2643
catgtggcat acaaagcaat acccattaga caaggacatt ttacttcttc cagaagaaaa 2703
ggcctttcag tcatttgaaa agagacttag acgaacctgt ggctacctag agttcttgc 2763
ttgaactggt ttgtgagaaa actcccattt ggggacttta tctcccagt gaaaccaatg 2823

gtcaggatga taccctaata cagtctggat ccacaaaggt attgtgtact ttaggggtta 2883
cacaagccac acgttaggaa atagcactgt ottatgttgt tcatataata tatatatata 2943
ttacagaaac atttactatt atatcatgtc tgttgaagag ggaatcatgc aggcagttat 3003
gcaggaggag aatggtccaa acgggactct gttctccagt gtatcagttg aggtccgaca 3063
tcttcatctt tgacttccta aatgtggta gatgcattta taatgtacaa taacatgcga 3123
catcattttg taaaattaac aggggagaaa gtaacaagag gtgtagatca gtctgttagt 3183
cacatcaaat ctgaggccaa atagcctcga ttaaccgggt agttcaggag cgcagacagc 3243
ttgctttgct gcactcttgg accaagaatg gtaaggacgc ttgtatatatt gaaaacgtat 3303
gggaggcacg aggaaacgga cttttttag taagacaaaa taaaataaat atgtttgtca 3363
ctaacagtac atcagcagtc atgtcattaa ccaaactgtg tgcattgtatc attttctct 3423
tatggagatt ttcttttct gtttccagtt tcttgattc agatgttgaa ttaaagtta 3483
gataatgctt ctcttggtc tagctcttct ttcttggta tcttctctct gtctgtcttg 3543
aggatactgt accagaagac actgttccaa aacacgactg atacagagtg acttcttttg 3603
ttggctgtaa gtttatttc agtttctaaa atgccttttt actttatata actacataag 3663
ctccttacat tggctgaga aaagaaatag ccatgttttc tttctgtaa cactgaggaa 3723
tgggttataa agagacagag aggtggtgat tttctaaagc tctgtcaacc agccactcta 3783
gataagcgtt gttcttgttt ctcaaagatg atgcaaacca gtttctctc tgccttaca 3843
atgtgcaaca tatataaaga gttttgtgaa tgggaatctg ataccttgcc atgtttctgg 3903

tagcgctccc gggctggcac tgcgccacgt gggagacttt tgattaattt actagtaatt 3963

aactccacag gactgactcc ttttagtttt aaagtagcgc tgacgtatct aaaaacgcct 4023

aggcgctgcc tgcgagtgtt ggagttactg ctttgacaaa ttaaagtaat ggagattgtg 4083

ttcttattta aatgaaacca catattatcc actcaggaat aaaaaaaaaa tcctaactgc 4143

tt

4145

<210> 6

<211> 384

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Thr Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ser Trp Ala Gly Arg Arg Ile
20 25 30

Pro Val Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Leu Ala Ile Gly Gly Thr Leu Ala
35 40 45

Asn Gly Met Val Ile Tyr Leu Val Ser Ser Phe Arg Lys Leu Gln Thr
50 55 60

Thr Ser Asn Ala Phe Ile Val Asn Gly Cys Ala Ala Asp Leu Ser Val

65	70	75	80
Cys Ala Leu Trp Met Pro Gln Glu Ala Val Leu Gly Leu Leu Pro Ala			
	85	90	95
Gly Ser Ala Glu Pro Pro Gly Asp Trp Asp Ser Gly Gly Gly Ser Tyr			
	100	105	110
Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Leu Gly Leu Gly Leu Thr Val Ser Leu			
	115	120	125
Leu Ser His Cys Leu Val Ala Leu Asn Arg Tyr Leu Leu Ile Thr Arg			
	130	135	140
Ala Pro Ala Thr Tyr Gln Val Leu Tyr Gln Arg Arg His Thr Ala Gly			
145	150	155	160
Met Leu Ala Leu Ser Trp Ala Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Leu Leu			
	165	170	175
Pro Pro Trp Ala Pro Lys Pro Gly Ala Glu Pro Pro Gln Val His Tyr			
	180	185	190
Pro Ala Leu Leu Ala Ala Gly Ala Leu Leu Ala Gln Thr Ala Leu Leu			
	195	200	205
Leu His Cys Tyr Leu Gly Ile Val Arg Arg Val Arg Val Ser Val Lys			

210

215

220

Arg Val Ser Val Leu Asn Phe His Leu Leu His Gln Leu Pro Gly Cys
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Ala Ala Phe Pro Ala Ala Pro His Ala Pro Gly Ala
 245 250 255

Gly Gly Ala Ala His Pro Ala Gln Pro Gln Pro Leu Pro Ala Ala Leu
 260 265 270

Gln Pro Arg Arg Ala Gln Arg Arg Leu Ser Gly Leu Ser Val Leu Leu
 275 280 285

Leu Cys Cys Val Phe Leu Leu Ala Thr Gln Pro Leu Val Trp Val Ser
 290 295 300

Leu Ala Ser Gly Phe Ser Leu Pro Val Pro Trp Gly Val Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Ser Trp Leu Leu Cys Cys Ala Leu Ser Ala Leu Asn Pro Leu Leu Tyr
 325 330 335

Thr Trp Arg Asn Glu Glu Phe Arg Arg Ser Val Arg Ser Val Leu Pro
 340 345 350

Gly Val Gly Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Pro

355

360

365

Ala Met Ser Gln Ala Gln Leu Gly Thr Arg Ala Ala Gly Gln His Trp

370

375

380

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Strg-AS1, a phosphorothioate antisense oligonucleotide for GPR88 gene

<400> 7

gtcattctgg ccaactct

18

<210> 8

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA comprising polyadenylation signal

<400> 8

tcgacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaa

54

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA comprising polyadenylation signal

<400> 9

tgcatgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa ttgtgatgc tattgcttta ttg 54

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA comprising polyadenylation signal

<400> 10

tgcatctag ttgtggttg tccaaactcg agcccgagg 39

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA comprising polyadenylation signal

<400> 11

gtaccccg gctcgagttt ggacaaacca caactagaa 39

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA comprising two CRE sequences

<400> 12

tcgacggtat cgattcgact gacgtcatatc ttgacgtcac

40

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA comprising two CRE sequences

<400> 13

tcgagtgacg tcaagtatga cgtcagtcga atcgataccg

40

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G alpha s4 gene specific PCR primer

<400> 14

tataagcttg ccgccgcat gggctgcct

29

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G alpha s4 gene specific PCR primer

<400> 15

attgttacct ctcttagagc agctcgtaact gacg

34

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA encoding
C-terminal five amino acid residues of G alpha q

<400> 16

caccttcgtg agtacaatct ggtctaac

28

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA encoding
C-terminal five amino acid residues of G alpha q

<400> 17

tcgagttaga ccagattgta ctcacgaagg tgcattg

36

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA encoding
C-terminal five amino acid residues of G alpha i

<400> 18

caccttcgtg attgttgtct ctttta

26

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA for construction of a double-stranded DNA encoding
C-terminal five amino acid residues of G alpha i

<400> 19

aagcttaaaa gagaccacaa tcacgaaggt gcatg

35

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V2 gene specific PCR primer

<400> 20

tatggatcca gcccacccat gctcatggcg

30

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V2 gene specific PCR primer

<400> 21

aatgtacct cctcacgatg aagtgtcctt gg

32

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GPR12 gene specific PCR primer

<400> 22

agtcaagctt gttgaagagg acaggggtta aaatg

35

<210> 23

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> GPR12 gene specific PCR primer

<400> 23
 tttatagcgg ccgcaagggt gctacacatc actgggc

37

<210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pAGal9-nd specific sequencing primer

<400> 24
 cggagactct agagggtata taatg
 25

<210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pAGal9-nd specific sequencing primer

<400> 25
 ctaatacgac tcactatagg g
 21

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GPR88 specific PCR primer

<400> 26

ggaagcttcc accatgacca actcctcctc cacatc

36

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GPR88 gene specific PCR primer

<400> 27

cgctcgagtt accagtgtg gcccgcg

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15982

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ A61K45/00, A61K31/505, A61K31/506, A61K31/7088, A61K31/7125, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/18, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ A61K45/00, A61K31/505, A61K31/506, A61K31/7088, A61K31/7125, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/18, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS, GENBANK, EMBL, DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 01/36634 A1 (CENT ADVANCED SCI. & TECHNOLOGY INCUBATION LTD.), 25 May, 2001 (25.05.01), Full text; Claims; sequence Nos. 1 to 9 & AU 2001/14157 B	1-14, 58, 59 15-57, 60, 61
X A	WO 02/4624 A1 (TAKEDA CHEM. IND. LTD.), 17 January, 2002 (17.01.02), Full text; Claims; page 24, line 17 to page 27, line 16; sequence Nos. 1, 2 & AU 2001/71025 B & JP 2002-330777 A & US 2004/38238 A	1-14, 58, 59 15-57, 60, 61

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 March, 2004 (19.03.04)

Date of mailing of the international search report
13 April, 2004 (13.04.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15982

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 01/2567 A1 (MILLENNIUM PHARM. INC.), 11 January, 2001 (11.01.01), Full text; Claims; page 21, line 21 to page 33, line 22 & AU 2000/59123 B & EP 1190052 A1 & JP 2003-504023 A	1-14, 58, 59 15-57, 60, 61
X A	MIZUSHIMA, K. et al., 'A novel G-protein-coupled receptor gene expressed in striatum.', Genomics, 2000, Vol.69, No.3, pages 314 to 321; full text; DISCUSSION	1-14, 58, 59 15-57, 60, 61
X	US 2002/156087 A (USA), 24 October, 2002 (24.10.02), Full text; Claims; Par. Nos. [0010] to [0014], [0020] to [0028]; Registry No.: 252904-38-4, 252916-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1, 403809-69-8 (Family: none)	1, 2, 15-58, 60, 61
X	WO 02/20495 A2 (CHIRON CORP.), 14 March, 2002 (14.03.02), Full text; Claims; Registry No.: 252904-38-4, 252916-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1, 403809-69-8 & AU 2001/95026 B & EP 1317433 A1	1, 2, 15-58, 60, 61
X	WO 99/31073 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO. LTD.), 24 June, 1999 (24.06.99), Full text; tables 4 to 9 & AU 9915071 B & EP 1054004 A1 & US 6432963 A	38-54
P, X	WO 03/87366 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 23 October, 2003 (23.10.03), Sequence No.: 87 (Family: none)	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15982

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 62-65

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 62 to 65 involve methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15982

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl⁷ A61P25/30, A61P43/00, C07D239/48, C07D403/04, C07D401/04,
C07D401/12, C07D405/12, C07D405/14, C07D409/12, C07D491/10

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl⁷ A61P25/30, A61P43/00, C07D239/48, C07D403/04, C07D401/04,
C07D401/12, C07D405/12, C07D405/14, C07D409/12, C07D491/10

Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

<Noncompliance with unity>

- [1] Claims 1 to 14, 58 and 59 (referred to as invention group 1).
- [2] Claims 15 to 57, 60 and 61 (referred to as invention group 2).

A preventive and/or a remedy for central diseases containing a compound
of the formula (I) as the active ingredient as specified in, for example,
claim 26 had been known before the priority date of the present case,
as reported in the following documents cited in Box C of the present
international search report:

·US 2002/156087 A (USA) 24 October, 2002 (24.10.02), full text, claims,
Par. Nos. [0010] to [0014], [0020] to [0028], Registry No.: 252904-38-4,
252916-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1, 403809-69-8 (Family: none)
·WO 02/20495 A2 (CHIRON CORP.) 14 March, 2002 (14.03.02), full text, claims
Registry No.: 252904-38-4, 252916-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1,
403809-69-8 & AU 2001/95026 B & EP 1317433 A1.

Also, the compounds themselves involved in the scope of the formula
(IA) as specified in claim 38 had been known before the priority date
of the present case, as reported in the following document cited in BOX
C of the present international search report:

·WO 99/31073 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 24 June, 1999
(24.06.99), full text, tables 4 to 9 & AU 9915071B & EP1054004 A1 & US
6432963 A.

Accordingly, it does not appear that there is any special technical
feature simultaneously common to at least all of the inventions of the
invention group 1 involving embodiments not having the compounds as
specified by the formula (I) or the formula (IA) as matters specifying
the inventions and all of the inventions of the invention group 2.

Such being the case, the above-described invention group 1 and the
invention group 2 are not considered as relating to a group of inventions
so linked as to form a single general inventive concept.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15982

<Scope of search>

The preventives and/or remedies as set forth in claims 1 to 9, 58 and 59 comprise, as the active ingredient, compounds defined by a desired property "having an effect of inhibiting the function of G-protein coupled receptor 88 (GPR88)". Although the above claims involve any compounds having this property, it is recognized that only small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the compounds having the property as "a compound having an effect of inhibiting the function of G-protein coupled receptor 88 (GPR88)" cannot be specified. Thus, claim 1 does not comply with the requirement of clearness in accordance with PCT Article 6 too.

Concerning the above compounds, therefore, the search was made mainly on the following active ingredients of medicinal compositions:

- the oligonucleotide as set forth in claim 10; or
- among the compounds as set forth in claims 15, 26 and 38, those which are known as relating to GPR88 or central diseases.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, A61K31/505, A61K31/506, A61K31/7088, A61K31/7125, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/18, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P25/30, A61P43/00, C07D239/48, C07D403/04, C07D401/04, C07D401/12, C07D405/12, C07D405/14, C07D409/12, C07D491/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, A61K31/505, A61K31/506, A61K31/7088, A61K31/7125, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/18, A61P25/22, A61P25/24, A61P25/28, A61P25/30, A61P43/00, C07D239/48, C07D403/04, C07D401/04, C07D401/12, C07D405/12, C07D405/14, C07D409/12, C07D491/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS, GENBANK, EMBL, DDBJ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/36634 A1 (CENT ADVANCED SCI & TECHNOLOGY INCUBATION LT D) 2001. 05. 25 文献全体、請求の範囲、配列番号1-9 & AU	1-14, 58, 59
A	2001/14157 B	15-57, 60, 61

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 03. 2004

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4 C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 02/4624 A1 (TAKEDA CHEM IND LTD) 2002.01.17 文献全体、 請求の範囲、p. 24第17行-p. 27第16行、配列番号 1, 2 & AU 2001/71025 B & JP 2002-330777 A & US 2004/38238 A	1-14, 58, 59 15-57, 60, 61
X A	WO 01/2567 A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 2001.01.11 文献全 体、claims、p. 21第21行-p. 33第22行 & AU 2000/59123 B & EP 1190052 A1 & JP 2003-504023 A	1-14, 58, 59 15-57, 60, 61
X A	MIZUSHIMA, K. et al. 'A novel G-protein-coupled receptor gen e expressed in striatum.' Genomics, 2000, vol. 69, no. 3, p. 3 14-321 文献全体、DISCUSSION	1-14, 58, 59 15-57, 60, 61
X	US 2002/156087 A (USA) 2002.10.24 文献全体、claims、[001 0]-[0014]、[0020]-[0028] Registry No.: 252904-38-4, 25291 6-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1, 403809-69-8 (ファミリーなし)	1, 2, 15-58, 60, 61
X	WO 02/20495 A2 (CHIRON CORPORATION) 2002.03.14 文献全体、 claims Registry No.: 252904-38-4, 252916-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1, 403809-69-8 & AU 2001/95026 B & EP 13174 33 A1	1, 2, 15-58, 60, 61
X	WO 99/31073 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO LTD) 1999.06.24 文献全体、表4-9 & AU 9915071 B & EP 1054004 A1 & US 6432963 A	38-54
P, X	WO 03/87366 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 2003.10.23 配列番号 87 (ファミリーなし)	10

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 62-65 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲62-65は、治療による人体の処置方法に関する態様を含むものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<単一性違反について>

- [1] 請求項1-14, 58, 59 (... 発明群1とする)
[2] 請求項15-57, 60, 61 (... 発明群2とする)

例えば請求項26に規定される、式(I)の化合物を有効成分として含有する中枢疾患の予防および/または治療剤は、本国際調査報告のC欄で引用された

- US 2002/156087 A (USA) 2002.10.24 文献全体、claims、[0010]—[0014]、[0020]—[0028] Registry No.: 252904-38-4, 252916-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1, 403809-69-8 (ファミリーなし)
- WO 02/20495 A2 (CHIRON CORPORATION) 2002.03.14 文献全体、claims Registry No.: 252904-38-4, 252916-61-3, 403807-97-6, 403808-31-1, 403809-69-8 & AU 2001/95026 B & EP 1317433 A1

に記載されているように本願優先日前既知であるし、また例えば請求項38に規定される、式(IA)に包含される化合物自体、本国際調査報告のC欄で引用された

- WO 99/31073 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO LTD) 1999.06.24 文献全体、表4-9 & AU 9915071 B & EP 1054004 A1 & US 6432963 A

に記載されているように本願優先日前これまた知られたものであることから、少なくとも、式(I)もしくは式(IA)に規定される化合物を発明特定事項として含まない態様を包含する発明群1の発明の全てが、発明群2の発明の全てとの間で特別な技術的特徴を同時に共有しているとみることはできない。

よって、上記発明群1及び発明群2は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

<調査の範囲について>

請求の範囲1-9, 58, 59中で規定されている予防および/または治療剤もしくはGPR88の機能抑制剤は、「G蛋白質共役型レセプター蛋白質88 (GPR88; G-Protein coupled receptor 88) の機能抑制作用を有する」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とするものである。そして、上記各請求項は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎないものと認められる。

また、「G蛋白質共役型レセプター蛋白質88の機能抑制作用を有する化合物」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって調査は、上記化合物として、

- ・請求項10規定の特定のオリゴヌクレオチド

又は

- ・請求項15, 26, 38のいずれかに規定される化合物のうち、GPR88との関連もしくは中枢疾患との関連について知られているものである医薬製剤の有効成分を主な対象として行った。

THIS PAGE BLANK (USPTO)